Diastereomere Dipeptide Analyse und Trennung zumal durch Verteilung von diastereomeren Dipeptiden

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Helmut Pfrommer

aus Stuttgart

1964

7978

Diastereomere Dipeptide

Analyse und Trennung

zumal durch Verteilung von diastereomeren Dipeptiden

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Helmut Pfrommer

aus Stuttgart

1964

Tag der mündlichen Prüfung: 10.Dezember 1964

D e k a n : Professor Dr. P. Roquette

1. Berichterstatter: Professor Dr.Dr.h.c. W. Hückel

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. W.Hückel und Herrn Dr.H.Feltkamp am Pharmazeutisch-chemischen Institut der Universität Tübingen ausgeführt.

Meinen hochverehrten Lehrern

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. W. Hückel
und

Herrn Dr. H.Feltkamp

möchte ich für Anleitung und Unterstützung dieser Arbeit herzlich danken.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

Seite:

Theoretischer Teil

Einleitung 1

Aufgabe der Arbeit 4

Zusammenfassung der Ergebnisse 7

I. Wege zur Synthese von Dipeptiden 10

Schutz der NH_2-Gruppe 10

1. p-Toluolsulfonylgruppe 10
2. Triphenylmethylgruppe 11
3. t-Butyloxycarbonylgruppe 11
4. Carbobenzoxygruppe 11

Schutz der Carboxyl-Gruppe 12

1. Methyl- und Äthylester 12
2. Benzylester 12
3. Tert. Butylester 12

Knüpfung der Peptidbindung 12

1. Azidmethode 13
2. Carbodiimidmethode 14
3. Gemischte Anhydridmethode 14

II. Analytische Trennung und Nachweis diastereomerer Dipeptide 16

1. Dünnschichtchromatographie 17

Dünnschichtchromatographie geschützter Dipeptide 20

Bestimmung der unteren Nachweisgrenze 20

Bestimmung der Nachweisbarkeit zweier Diastereomerer nebeneinander 20

2. Kolorimetrie 22
3. Säulenchromatographie 22
4. Craigverteilung 24

III. Präparative Verteilung 31

1. L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid 31
2. DL-Leucyl-L-leucin 31

Seite:

Experimenteller Teil

I. Synthesen 34

1. L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid 34
L-Leucinäthylester.HCl 34
L-Leucinäthylester 34

2. DL-Leucyl-L-leucin 36
Carbobenzoxy-DL-leucin 36
L-Leucinbenzylester-p-toluolsulfonat 36
Carbobenzoxy-DL-leucyl-L-leucinbenzylester 37

3. L-Leucyl-L-leucin 41

4. DL-Leucyl-L-phenylalanin 42
L-Phenylalaninbenzylester-p-toluolsulfonat 42
L-Phenylalaninbenzylester 42
Carbobenzoxy-DL-leucyl-L-phenylalaninbenzylester 43

5. DL-Phenylalanyl-L-leucin 44
Carbobenzoxy-DL-phenylalanin 44
Carbobenzoxy-DL-phenylalanin-L-leucinbenzylester 44

6. Carbobenzoxy-L-leucyl-L-phenylalaninäthylester 45
L-Phenylalaninäthylester.HCl 45
L-Phenylalaninäthylester 46

7. Carbobenzoxy-D-leucyl-L-phenylalaninäthylester 47

II. Analytik 49

1. Dünnschichtchromatographie 49
Technik 49
Schichten 49
Laufmittel 49
Nachweis 50

Seite:

Chromatographieren versch. Dipeptide 50
Bestimmung der unteren Nachweisgrenze 52
Bestimmung der geringsten Nachweisbarkeit zweier Diastereomerer nebeneinander 52

2. Kolorimetrie 53
Herstellung des Ninhydrinreagenzes 53

3. Säulenchromatographie 53
Technik 53

Beispiele:
a) DL-Leucyl-L-leucin 54
b) DL-Alanyl-L-leucin 55

4. Craigverteilung 56
Lösungsmittelsysteme 56
Technik 56
Bestimmung des Verteilungskoeffizienten 57
Berechnung von Verteilungen 58

Beispiele:
a) L-Leucyl-L-leucin, D-Leucyl-L-leucin 59
b) L-Leucyl-L-tyrosin, D-Leucyl-L-tyrosin 59
c) DL-Leucyl-L-phenylalanin 61
d) DL-Phenylalanyl-L-leucin 63
e) DL-Alanyl-L-leucin 65
f) DL-Alanyl-DL-valin 70
g) Carbobenzoxy-L-leucyl-L-phenylalaninäthylester 72
h) Carbobenzoxy-D-leucyl-L-phenylalaninäthylester 73

III. Präparative Verteilung 74
Apparatur und Technik 74
Beispiele:
1. L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid 75
2. DL-Leucyl-L-leucin 78

IV. Deutung der IR-Spektren von Dipeptiden 81

- - - -

Theoretischer Teil

Einleitung

In der Natur finden sich Aminosäuren hauptsächlich in den Eiweißstoffen. Die Zahl der Aminosäuren, die am Aufbau bisher untersuchter Proteine beteiligt sind, beträgt etwa 25. Daneben ist noch eine große Anzahl selten vorkommender bekannt geworden. Die allermeisten der natürlich vorkommenden Aminosäuren besitzen die L-Konfiguration, was K.FREUDENBERG, W.KUHN und J.BUMANN[1] am Alanin sichern konnten. Es sind nur einige wenige Ausnahmen bekannt, bei denen D-Konfiguration vorliegt, z.B. im Gramicidin ein D-Phenylalanin[2].

Es ist von Interesse, Peptide mit einer oder mehreren D-Aminosäuren zu synthetisieren, um feststellen zu können, ob es für die Wirksamkeit der betreffenden Substanz von Bedeutung ist, in welcher Konfiguration die Aminosäure vorliegt. Man kann damit auch das wirksame Zentrum des Peptids festlegen und den Angriffspunkt von Antagonisten näher untersuchen.

DU VIGNEAUD[3] synthetisierte D-Leucin-ocytocin, prüfte dieses Diastereomere des natürlich vorkommenden Ocytocins auf seine biologische Wirksamkeit und stellte dabei entscheidende Unterschiede fest. G.I.TESSLER und R.J.F.NIVARD[4] synthetisierten das Pentapeptid L-Alanyl-D-glutamyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanin und konnten es als Bestandteil

---

1) K.FREUDENBERG, W.KUHN und J.BUMANN, Ber.dtsch.chem. Ges. 63, 2380 (1930).

2) R.L.M.SYNGE, Biochem. J. 39, 363 (1945).

3) C.H.SCHNEIDER und V.DU VIGNEAUD, J.Amer.chem.Soc. 84, 3005 (1962).

4) G.I.TESSLER und R.J.F.NIVARD, Recueil Trav.chim. Pays-Bas 83, 53 (1964).

von Bakterienzellwänden identifizieren.

Aminosäuren werden überwiegend aus Proteinen hergestellt, die durch Hydrolyse in ihre Bausteine zerlegt werden. Diese Methode ist aber für die Gewinnung von D-Aminosäuren ungeeignet, da sie in der Natur nur selten vorkommen. Man ist bei ihrer Darstellung auf eine Spaltung racemischer Aminosäuren in die Antipoden angewiesen. Dies läßt sich folgendermaßen durchführen:

1. Durch Kristallisation[5)6)]: Dabei werden die Aminosäuren zuerst N-acyliert, damit sie ihren Zwitterionencharakter verlieren. Dann wird als Alkaloidsalz fraktioniert kristallisiert und anschließend die Acylgruppe wieder abgespalten.

   D.F.HOLMES und R.ADAMS[7)] stellten aus der racemischen Aminosäure und L-Menthoxyacetylchlorid nach Schotten-Baumann diastereomere Derivate her, trennten diese dann durch Kristallisation und spalteten den N-Acyl-Rest mit Bromwasserstoff wieder ab. Ebenfalls über ein Derivat trennte S.BERLINGOZZI[8)] racemische Aminosäuren. Er verknüpfte die DL-Form mit D- oder L-Mandelsäure und erhielt durch Umkristallisieren diastereomere Derivate. T.KATO und Y.TSUCHIYA[9)10)] stellten Salze von N-Acyl-aminosäuren und optisch aktiven Aminosäureamiden her und

---

5) J.P.GREENSTEIN und M.WINITZ, "The Chemistry of the Amino Acids", J.Wiley & Sons, Inc., New York/London 1961, S.715 ff.

6) E.FISCHER und O.WARBURG, Ber.dtsch.chem.Ges. 38, 3997 (1905).

7) D.F.HOLMES und R.ADAMS, J.Amer.chem.Soc. 56, 2093 (1934).

8) S.BERLINGOZZI, G.ADEMBRI und G.BUCCI, Gazz. chim. ital. 84, 383 (1954).

9) T.KATO und Y.TSUCHIYA, Agr.Biol.Chem. 26, 467 (1962).

10) T.KATO und Y.TSUCHIYA, Agr. Biol. Chem. 26, 473 (1962).

trennten diese durch Kristallisation.

2. Durch spezifisch wirkende Enzyme[11]: Schon E.SCHULZE und E.BOSSHARD[12] konnten zeigen, daß Penicillium glaucum die L-Form von Glutaminsäure und Leucin aufnahm und die D-Form übrig ließ. Auf diese Weise kann man auch aus DL-Arginin mit Arginase D-Arginin erhalten[13].

   C.NEUBERG und K.LINHARDT[14] schieden durch eine enzymatische Hydrolyse mit Takadiastase aus N-Benzoyl-DL-alanin die L-Form ab. Später fanden S.M.BIRNBAUM, L.LEVINTOW, R.B.KINGSLEY und J.P.GREENSTEIN[15], daß N-Acetyl- und N-Chloracetylaminosäuren der L-Reihe durch Nierenacylase sehr rasch gespalten werden, die D-Formen dagegen nicht.

3. Durch asymmetrische Synthese[16]: S.AKABORI und Mitarbb.[17] gelang es in Gegenwart des optisch aktiven Katalysators Palladium auf Seidenfibroin, L-Glutaminsäure durch Hydrieren von α-Acetoxyiminoglutamat zu synthetisieren. Auf ähnliche Weise lassen sich auch andere optische Antipoden herstellen, die rein nur in geringer Ausbeute erhalten werden.

---

11) Lit.5), S.728 ff.

12) E.SCHULZE und E.BOSSHARD, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 10, 134 (1886).

13) A.HUNTER und J.A.DAUPHINEE, J.biol.Chemistry 85, 627 (1930).

14) C.NEUBERG und K.LINHARDT, Biochem.Z. 147, 372 (1924).

15) S.M.BIRNBAUM, L.LEVINTOW, R.B.KINGSLEY und J.P.GREENSTEIN, J.biol.Chemistry 194, 455 (1952).

16) Lit. 5), S.148 ff.

17) S.AKABORI u. Mitarbb., Nature 178, 324 (1956).

Aufgabe der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Trennung racemischer Aminosäuren durch Verteilung zu erzielen. Dafür boten sich verschiedene Wege an:

1. Man kann DL-Aminosäuren in Phasen verteilen, die ein optisch aktives Lösungsmittel enthalten. Es wurde versucht, ob sich unter Verwendung von optisch aktivem Amylalkohol die eine Form besser löst als die andere. Es kommt dabei zu einer schwachen Wechselwirkung zwischen dem optisch aktiven Lösungsmittel und der racemischen Aminosäure, die physikalisch bedingt ist. Ein unterschiedliches Verteilungsverhalten ergab sich aber daraus nicht.

2. Eine weitere Möglichkeit ist der Zusatz eines optisch aktiven Amins zu einem inaktiven Lösungsmittelsystem. Zu diesem Zweck wurde Bornyl-Isobornylamin synthetisiert, durch Gegenstromverteilung getrennt und das optisch aktive Amin den Phasen zugesetzt. Es wurde erwartet, daß letzteres mit der Aminosäure komplexartige Anlagerungsverbindungen bilden würde, die bei der D- und L-Form verschieden beständig sind. Es wäre also hier eine chemische Wechselwirkung zwischen den optischen Antipoden der Aminosäure und dem optisch aktiven Amin denkbar. Aber auch diese Versuche blieben ohne Erfolg.

3. Verteilung diastereomerer Derivate: Anknüpfend an die Versuche von S.BERLINGOZZI u.Mitarbb.[8] und D.F.HOLMES und R.ADAMS[7] wurden L-Menthyloxyacetylaminosäuren hergestellt. Durch Verteilung konnte dieses Derivat nicht getrennt werden. Ebensowenig ging es mit L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid.

   Als weitere Derivate wurden Dipeptide untersucht. Diese bilden wie die Aminosäuren[18] innermolekulare

---

18) R.WILLSTÄTTER, Ber.dtsch.chem.Ges.35, 589 (1902).

Salze, die so zustande kommen, daß eine Trennung der Ladungen innerhalb des Moleküls stattfindet. Die Carboxylgruppe trägt die negative, die Aminogruppe die positive Ladung. Solche Stoffe besitzen ein großes Dipolmoment, das sich aber nicht direkt bestimmen läßt, da Dipeptide und Aminosäuren in unpolaren Lösungsmitteln nur schlecht löslich sind. Als Lösungsmittel kommen hier nur Wasser oder Alkohol in Betracht. Die Dielektrizitätskonstante des Wassers ändert sich beim Lösen eines starken Dipols und zwar nimmt sie mit steigender Konzentration zu. Die Änderung bezeichnet man als dielektrisches Inkrement $\frac{d\epsilon}{dc}$. Solche Messungen wurden von G.DEVOTO[19)20)] und J.WYMAN JR.[21)] durchgeführt. Die Größe des dielektrischen Inkrementes ist abhängig vom Abstand der Carboxyl- und der Aminogruppe innerhalb des Moleküls; wird er größer, so erhält man entsprechend höhere Werte. J.WYMAN JR. und T.L.MC MEEKIN[22)] konnten zeigen: je mehr Kohlenstoffe sich zwischen den funktionellen Gruppen einer Aminosäure oder eines Dipeptids befinden, desto größer wird das Inkrement. Daraus sieht man, daß die innermolekularen Salze keine Ringstruktur besitzen.

Weder die Aminosäuren noch die Dipeptide zeigen entscheidende Unterschiede, aber zu einem kleinen Teil besteht auch eine Abhängigkeit des dielektrischen Inkrementes von der Stellung und der Natur der geladenen Gruppen. Bei Glycyl-glycin beträgt $\frac{d\epsilon}{dc}$ beispielsweise +70, bei Glycyl-leucin +54 [23)]. Solche Unterschiede

---

19) G.DEVOTO und M.STEVENSON, Gazz.chim.ital.60, 199 (1930), 60, 520 (1930), 61, 897 (1931).

20) G.DEVOTO, Ber.dtsch.chem.Ges. 76, 1985 (1934).

21) J.WYMAN JR., Chem.Reviews 19, 213 (1936).

22) J.WYMAN und T.L.MC MEEKIN, J.Amer.chem.Soc. 55, 908 (1933).

23) W.HÜCKEL, "Theoretische Grundlagen der organischen Chemie", Akademische Verlagsgesellschaft Geest und Portig K.-G., Leipzig 1957, S.126.

können, wenn sie auch gering sind, bei diastereomeren Dipeptiden einen unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten bedingen.

Außerdem läßt sich eine Aneinanderlagerung zweier Diastereomerer über eine Wasserstoffbrückenbindung an der Aminogruppe denken. Dabei ist es möglich, daß die unterschiedliche Stellung am α-Kohlenstoffatom das Verteilungsverhalten beeinflußt, wie G.KORTÜM, A.BITTEL[24] und H.FELTKAMP[25)26)] an Cyclohexylaminen zeigen konnten.

Der Nachteil der Trennung von Racematen über Derivate besteht darin, daß diese wieder gespalten werden müssen. Dies gelingt nur selten, ohne daß es zu einer teilweisen oder vollständigen Racemisierung kommt. Bei den Dipeptiden kann man dies umgehen, indem man die Aminosäuren verknüpft, die man weiterverarbeiten will, und umgeht so eine Spaltung. Damit verlegt man die verlustreiche Synthese auf eine Stufe vorher. Man benötigt nur eine L-Aminosäure und eine DL-Aminosäure. Nach der Verteilung ergibt sich daraus dann ein Dipeptid mit zwei L- und eines mit einer L- und einer D-Aminosäure. Hier braucht also keine teure D-Aminosäure in die Synthese eingesetzt zu werden; es ist daher auch eine Synthese mit geringer Ausbeute tragbar.

Eine Racemisierung während der Synthese tritt in den Hintergrund. Zur Racemisierung kommt es immer an der Aminosäure mit freier Carboxyl- und geschützter Aminogruppe[27)]. Die zweite Komponente, die als Ester vorliegt, behält ihre Konfiguration bei. Man muß also darauf achten, daß die NH_2-Gruppe der optisch aktiven Aminosäure mit der Carboxylgruppe der DL-Komponente reagiert.

---

24) G.KORTÜM und A.BITTEL, Chemie-Ing.-Tech. 30, 95 (1958).

25) H.FELTKAMP und W.KRAUS, Liebigs Ann.Chem. 651, 11 (1962).

26) H.FELTKAMP, Arch.Pharmaz. 295, 764 (1962).

27) Lit. 5), S.974 ff.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach der gemischten Anhydridmethode wurde L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid hergestellt. Das aus der Synthese erhaltene Rohprodukt wurde durch Verteilung mit den Phasen Petroläther (50-70°), Essigester 1:1/Methanol, Wasser 1:1 gereinigt. Es wurde versucht, die Reinsubstanz durch Gegenstromverteilung über 4 Kolonnen mit den Phasen Petroläther (50-70°), Essigester 8:2/Methanol, Wasser 6,5 : 3,5 in die Diastereomeren zu trennen. Nach Abdestillieren der Lösungsmittel wurde von jeder Fraktion der schweren und der leichten Phase die Drehung bestimmt. Da sich diese nicht änderte, konnte gezeigt werden, daß eine Trennung in die Diastereomeren nicht eingetreten ist.

Die Synthese von Dipeptiden wurde mit Carbobenzoxy-aminosäuren und Aminosäureestern nach der Dicyclohexylcarbodiimid- und der gemischten Anhydridmethode durchgeführt. Es wurde von einer DL- und einer L-Aminosäure ausgegangen und die erhaltenen Dipeptide durch Verteilung in ihre Diastereomeren getrennt.

Als geeignetes Analysenverfahren zeigte sich die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G- bzw. Celluloseplatten. Die Dipeptide ließen sich wie die freien Aminosäuren gut mit Ninhydrinlösung anfärben und ergaben eine blauviolette Farbe. Mit den Laufgemischen n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2 und Essigester, Pyridin, Eisessig, Wasser 5:5:1:3 gelang es eine Anzahl Dipeptide in ihre Diastereomeren zu trennen.

Ihre Anfärbbarkeit mit Ninhydrinreagenz wurde durch Bestimmung der unteren Nachweisgrenze festgelegt. Es zeigte sich dabei, daß 0,2 Mikrogramm noch zu erkennen waren. Der Gehalt an Dipeptid in den einzelnen Verteilungsfraktionen wurde kolorimetrisch mit Ninhydrin bestimmt. S.STEIN und W.H.MOORE[58] entwickelten ein Reagens

mit geeigneter Zusammensetzung, das mit Dipeptiden eine blauviolette Farbe ergibt, die bei 570 mμ ihr Absorptionsmaximum besitzt.

Unter gleichen Bedingungen wie bei der Dünnschichtchromatographie wurde versucht, über eine Säule die Trennung in die Diastereomeren zu erhalten. Beim DL-Alanyl-L-leucin war sowohl durch kolorimetrische Bestimmung des Chromatographieverlaufes als auch durch dünnschichtchromatographische Untersuchung der einzelnen Fraktionen eine Trennung sichtbar. Sie war beim DL-Leucyl-L-leucin ebenfalls zu sehen, aber nicht so ausgeprägt.

Durch Craigverteilung konnte mit Hilfe der kolorimetrischen Gehaltsbestimmung und der dünnschichtchromatographischen Analyse der einzelnen Elemente gezeigt werden, daß ein großer Teil der Dipeptide mit ausreichenden ß-Werten in ihre Diastereomeren getrennt werden können. Als Phasen wurden überwiegend n-Butanol/Wasser verwendet. Durch Zusatz von wenig Amylalkohol oder geglühtem Natriumsulfat wurde die Emulsionsbildung verringert. Durch Zusatz von Natriumphosphat konnte beispielsweise beim DL-Alanyl-L-leucin und DL-Alanyl-DL-valin die Löslichkeit in der schweren Phase herabgesetzt werden. Eine Trennung geschützter Dipeptide war nicht zu erzielen.

Durch Craigverteilung war es auch möglich, die Reinheit der Isomeren zu prüfen, da ein unterschiedlicher Verlauf der experimentell gefundenen und der berechneten Verteilungskurve auf eine Verunreinigung durch das andere Isomere schließen läßt. Es konnte dies am D-Leucyl-L-leucin gezeigt werden, das durch Umkristallisation von DL-Leucyl-L-leucin gewonnen worden war.

Eine Verunreinigung durch freie Aminosäure ließ sich beim DL-Leucyl-L-phenylalanin durch Craigverteilung gut nachweisen. Es war auch möglich, die Verunreinigung auf diese Weise abzutrennen.

Da durch Craigverteilung eine Trennung der Dipeptide in die Diastereomeren möglich war, wurde DL-Leucyl-L-leucin präparativ in einer Gegenstromapparatur über 4 Kolonnen verteilt. Die Substanz wurde in der Mitte zugegeben, und es konnte aus der schweren Phase reines D-Leucyl-L-leucin und aus der leichten Phase reines L-Leucyl-L-leucin isoliert werden, was durch die Drehung bewiesen werden konnte. Außerdem wurdenvon den Substanzen Craigverteilungen durchgeführt und es zeigte sich, daß der Verlauf der experimentell gefundenen mit der berechneten Kurve identisch ist, was nur bei Reinsubstanzen der Fall sein kann. So wurde gezeigt, daß die Gegenstromverteilung zur Trennung diastereomerer Dipeptide geeignet ist.

Die Untersuchung der IR-Spektren diastereomerer Dipeptide ergab keine charakteristischen Unterschiede. Die Banden der sehr komplexen Spektren sind vielfach schlecht ausgebildet.

I. Wege zur Synthese von Dipeptiden

Die Peptidsynthese stellt eine N-Acylierung dar, für die man alle Methoden der Anheftung eines Acylrestes, hier einer Aminosäure verwenden kann. Dabei verbindet sich der nukleophile Stickstoff der einen Komponente mit dem Kohlenstoff der Carboxylgruppe der anderen Aminosäure. Letzterer hat durch seine Mesomerie bzw. durch die Ausbildung eines Zwitterions seine elektrophile Eigenschaft fast völlig verloren, sodaß die Anlagerung erst nach einer Aktivierung möglich ist. Diese wird dadurch erreicht, daß man an den Kohlenstoff der Carboxylgruppe einen elektronenanziehenden Substituenten anheftet, der dann dort einen positiven Zustand erzeugt.
Bei der Peptidsynthese ist es notwendig, funktionelle Gruppen zu schützen. Durch zeitweise Substitution an der Amino- oder Carboxylgruppe erhält man die Verknüpfung in der gewünschten Sequenz und hebt gleichzeitig den Zwitterionenzustand auf. Die Schutzgruppen dürfen beim Einführen zu keiner Racemisierung führen, und sie müssen unter den Bedingungen der Synthese stabil bleiben.
Man verwendet heute ausschließlich solche Gruppen, die sich nach der Synthese leicht wieder abspalten lassen, ohne daß eine Spaltung der Peptidbindung eintritt.

Schutz der Aminogruppe:

1. Die p-Toluolsulfonylgruppe[28] läßt sich durch Reduktion zur Sulfingruppe mit Natrium in flüssigem Ammoniak abspalten. Diese Gruppe eignet sich besonders zur Peptidbildung nach der Carbodiimidmethode[29].

---

28) R.SCHÖNHEIMER, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 154, 203 (1926).

29) J.C.SHEEHAN und G.P.HESS, J.Amer.chem.Soc. 77, 1067 (1955).

2. Die Triphenylmethylgruppe[30)31)] wird mit verd. Säure oder durch katalytische Hydrierung leicht abgespalten. Auch dieser Rest eignet sich am besten zur Carbodiimidsynthese[29)], da er durch seine sterische Hinderung die Carboxylgruppe nicht so stark aktiviert.

3. Die t-Butyloxycarbonylgruppe[32)33)] läßt sich nur schlecht in Aminosäuren und Peptide einführen, hat aber den Vorteil, daß sie sich säurekatalytisch leicht entfernen läßt und dabei nur flüchtige Nebenprodukte entstehen (Kohlendioxyd, Isobuten).

4. BERGMANN und ZERVAS[34)] führten 1932 den Carbobenzoxyrest ein, der heute wegen seines ausgezeichneten Schutzes gegen Racemisierung[35)] überwiegend verwendet wird. Die Abspaltung gelingt durch katalytische Hydrierung mit Palladiummohr[36)] in Alkohol. Ein großer Vorteil besteht darin, daß dabei nur Toluol und Kohlendioxyd entstehen, die bei der Aufarbeitung nicht stören. Der Nachteil der Carbobenzoxyderivate besteht in ihrer schlechten Löslichkeit. Dies läßt sich durch Verwendung von p-Brom- und p-Nitrocarbobenzoxychlorid umgehen.

---

30) B.HELFERICH, L.MOOG und A.JÜNGER, Ber.dtsch.chem. Ges. 79, 4686 (1925).

31) A.HILLMANN-ELIES, G.HILLMANN und H.JATZKEWITZ, Z. Naturforsch. 8b, 445 (1953).

32) F.C. MC KAY und N.F.ALBERTSON, J.Amer.chem.Soc. 79, 4686 (1957).

33) G.W.ANDERSON und A.C. MC GREGOR, J.Amer.chem.Soc. 79, 6180 (1957).

34) M.BERGMANN und L.ZERVAS, Ber.dtsch.chem.Ges. 65 B, 1192 (1932).

35) G.C.STELAKATOS, J.Amer.chem.Soc. 83, 4222 (1961).

36) R.WILLSTÄTTER und E.WALDSCHMIDT-LEITZ, Ber.dtsch. chem.Ges. 54, 123 (1921).

Schutz der Carboxylgruppe:

1. Methyl- oder Äthylester[37] lassen sich in abs.Alkohol mit trockenem Salzsäuregas herstellen. Durch alkalische Verseifung kann man den Ester spalten .
2. Die Veresterung von Aminosäuren mit Benzylalkohol[38] in Gegenwart von Salzsäuregas ergab geringe Ausbeuten, da der Benzylrest zu einer sterischen Hinderung führte. Man verwendet heute als Katalysator die p-Toluolsulfonsäure, gibt Benzylalkohol im Überschuß zu und entfernt das entstehende Wasser durch eine azeotrope Destillation. Der Benzylester läßt sich wie der Carbobenzoxyrest durch katalytische Hydrierung mit Palladiummohr abspalten.
3. Tert. Butylester[39)40] sind ebenfalls wirksame Schutzgruppen bei der Peptidsynthese. Sie werden mit Butylacetat im Überschuß und Perchlorsäure als Katalysator hergestellt. Die Abspaltung gelingt mit Bromwasserstoff in Eisessig. Tert. Butylester sind gegenüber Alkalien beständig.

Knüpfung der Peptidbindung:

Es ist dabei besonders auf die Racemisierung am α-Kohlenstoffatom zu achten, deren Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist[41]. Mit Ausnahme der Azidmethode[42] kann die aktivierte Aminosäure racemisiert wer-

---

37) Lit. 5), S.925 ff.

38) E.ABDERHALDEN und S.SUZUKI, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 176, 101 (1928).

39) E.TASCHNER, A.CHIMIAK, B.BATOR und T.SOKOLOWSKA, Liebigs Ann. Chem. 646, 134 (1961).

40) R.ROESKE, J. org. Chemistry 28, 1251 (1963).

41) V.DU VIGNEAUD und C.E.MEYER, J. biol. Chemistry 99, 143 (1932).

42) T.CURTIUS, Ber.dtsch.chem.Ges. 35, 3226 (1902).

den[43)44)]. Dies wurde dadurch umgangen, daß möglichst die DL-Aminosäure aktiviert wurde.

Es ist ein entscheidender Vorteil, wenn man die Synthese mit einer DL- und einer L-Aminosäure durchführt und dann durch Trennung der Diastereomeren zu optisch einheitlichen Peptiden gelangt.

Bei der Darstellung der Dipeptide kann es zur Bildung von Dioxopiperazinen kommen. Diese zeigten sich vor allem beim Entfernen des Carbobenzoxy- und Benzylrestes durch Hydrierung, was durch Zugabe einiger Tropfen Säure weitgehend verhindert werden konnte.

Zur Darstellung von Dipeptiden haben sich folgende Verfahren bewährt:

1. Die Azidmethode[42)]: Zunächst wird das meist kristalline N-geschützte Aminosäurehydrazid aus einem entsprechenden Ester mit Hydrazinhydrat in Alkohol oder Dimethylformamid hergestellt, dann mit Nitrit zum Azid umgesetzt, das man in Essigester mit der Aminkomponente reagieren läßt.
   Bei dieser Methode wurde noch nie eine Racemisierung beobachtet, es treten aber Nebenreaktionen auf, wie z.B. Amidbildung[45)46)]. Diese lassen sich bei einer Temperatur von -10 bis 0° zurückdrängen. Bei der Umsetzung treten nur gasförmige Nebenprodukte auf, sodaß die Aufarbeitung leicht ist. Das Reaktionsprodukt wird in Essigester aufgenommen und mit verd. Salzsäure, Natriumbikarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über geglühtem Natriumsulfat destilliert man das Lösungsmittel im Vakuum ab.

---

43) H.SCHWARZ und F.M.BUMPUS, J.Amer.chem.Soc.81, 890 (1959).

44) N.A.SMART, G.T.YOUNG und M.W.WILLIAMS, J.chem.Soc. (London) 3902 (1960).

45) V.PRELOG und P.WIELAND, Helv.chim.Acta 29, 1128 (1956).

46) B.HEGEDÜS, Helv.chim.Acta 31, 737 (1948).

2. Bei der Carbodiimidmethode[29] wird Dicyclohexylcarbodiimid zu einer Lösung der Amin- und Carboxylkomponente gegeben. Es entzieht den letzteren Wasser und geht in Dicyclohexylharnstoff über, der schwer löslich ist und ausfällt. Der genaue Reaktionsmechanismus ist dabei noch nicht vollständig geklärt[47]. Die Racemisierung läßt sich durch Verwendung möglichst unpolarer Lösungsmittel weitgehend zurückdrängen. Außerdem ist es vorteilhaft, bei etwa 0° zu arbeiten.
   Das zur Abtrennung des p-Toluolsulfonsäurerestes am Benzylester zugegebene Triäthylamin muß in genau stöchiometrischer Menge zugegeben werden, da ein Überschuß die Reaktion wesentlich verzögert[47]. Die Aufarbeitung ist bei den Dipeptiden sehr einfach, da der Dicyclohexylharnstoff fast vollständig auskristallisiert und abfiltriert werden kann.

3. Die gemischte Anhydridmethode. Hier wird die Carboxylgruppe der Aminosäure durch eine Hilfssäure aktiviert. Als günstigste haben sich die Kohlensäurehalbester[48)49)50] bewährt. Sie haben den Vorteil, daß die Säure nicht im Ansatz verbleibt, sondern als Kohlendioxyd entweicht. Man läßt die Lösung der N-geschützten Aminosäure in abs. Tetrahydrofuran in Gegenwart von Triäthylamin etwa 15 Min. bei -5 bis -10° mit Chlorameisensäureäthylester reagieren und gibt dann die Aminkomponente langsam zu. Die Gefahr der Racemisierung an der aktivierten Aminosäure ist hier groß, läßt sich aber bei den Dipeptiden durch Verwendung von

---

47) H.SCHÜSSLER und H.ZAHN, Chem.Ber. 95, 1076 (1962).

48) T.WIELAND und H.BERNHARD, Liebigs Ann.Chem. 572, 190 (1951).

49) R.A.BOISSONAS, Helv.chim.Acta 34, 874 (1951).

50) J.R.VAUGHAN jr. und R.L.OSATO, J.Amer.chem.Soc. 74, 676 (1952).

abs. Tetrahydrofuran und dem Carbobenzoxyrest als Schutzgruppe weitgehend zurückdrängen. Die Reaktion verläuft als Ionenreaktion fast momentan, sodaß diese Methode den geringsten Zeitaufwand erfordert.

Mit Alkoholen oder Wasser reagiert das gemischte Anhydrid praktisch nicht, sodaß die Aminkomponente auch in Wasser gelöst zugegeben werden kann. Aus demselben Grund läßt sich auch die Mandelsäure ohne Angriff auf die OH-Gruppe mit dieser Methode umsetzen.

II. Analytische Trennung und Nachweis diastereomerer Dipeptide

Voraussetzung für den Nachweis der Trennung diastereomerer Dipeptide ist ein geeignetes Analysenverfahren. Folgende Methoden wurden bisher angewandt:

1. Die optische Drehung[51]: Bei der Messung der spezifischen Drehung hat man mit einem Fehler von mindestens 2 bis 3% zu rechnen.

2. Man kann im sauren Milieu eine Totalhydrolyse durchführen und die isolierten Aminosäuren auf ihre sterische Einheitlichkeit prüfen. Hierbei tritt aber meist eine Racemisierung auf[52], sodaß das Ergebnis fehlerhaft wird. Dies läßt sich korrigieren, indem man die im Peptid vorhandenen Aminosäuren in einer Paralleluntersuchung einer entsprechenden Behandlung unterzieht und den beobachteten Racemisierungsgrad berücksichtigt[53].

3. Bei der Verwendung enzymatischer Verfahren[54] müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

   a) Das Enzym muß gegenüber dem zu untersuchenden Peptid genügend aktiv sein,

   b) das Peptid muß stereospezifisch gespalten werden,

   c) Peptidanteile, die nicht gespalten wurden, müssen sich gut nachweisen lassen,

   d) die Wirksamkeit des Enzyms darf weder durch Hydrolysenprodukte noch durch Verunreinigungen gehemmt werden.

   Eine unvollständige Spaltung kann sowohl durch das Vorhandensein von Diastereomeren, als auch durch Verunreinigungen bedingt sein. Man kann mit dieser Methode also nur gereinigte Peptide untersuchen.

---

51) Lit. 5), S.946.

52) A.NEUBURGER, Advances Protein Chem. 4, 339 (1948).

53) B.RINIKER und R.SCHWYZER, Helv.chim.Acta 44, 658 (1961).

54) Lit. 5), S.1254.

4. Gaschromatographische Trennung diastereomerer Dipeptide: F.WEYGAND u. Mitarbb.[55] gelang es, N-Trifluoracetyldipeptidäthylester gaschromatographisch auf Golaysäulen zu trennen. Er konnte 1% des einen neben 99% des anderen Diastereomeren noch nachweisen. Die Methode gestattet es allerdings nicht, zu zeigen, welche der beiden Komponenten racemisiert ist. Dafür kann das aus der Synthese erhaltene Rohprodukt direkt analysiert werden. Die benötigte Substanzmenge ist gering und die Methode läßt sich rasch durchführen.

5. Auch papierchromatographisch war es möglich, eine Trennung zu erzielen[53)56)57)].

Für die Trennung und den Nachweis diastereomerer Dipeptide wurden folgende Verfahren angewandt:

1. Dünnschichtchromatographie:

Diese erwies sich auf Kieselgel G-(Merck) und Celluloseschichten (Macherey und Nagel) als geeignete analytische Methode. Peptide ergeben mit Ninhydrin eine rotviolette Färbung und wurden so auf der Platte nachgewiesen. Die Farbentwicklung kam erst allmählich beim Erhitzen zustande. Sie trat bei Aminosäuren schneller und intensiver ein als bei den Dipeptiden; aber auch letztere unterschieden sich in ihrer Anfärbbarkeit, so wurde beispielsweise beim Besprühen von L-Alanyl-L-leucin eine intensivere Färbung beobachtet als beim D-Alanyl-L-leucin.

---

55) F.WEYGAND, A.PROX, L.SCHMIDHAMMER und W.KÖNIG, Angew. Chem. 75, 282 (1963).

56) J.W.HINMAN, E.L.CARON und H.N.CHRISTENSEN, J. Amer. chem. Soc. 72, 1620 (1950).

57) T.SOKOLOWSKA und J.F.BIERNAT, J.Chromatog. 13, 269 (1964).

Es gelang, folgende Dipeptide zu trennen:

a) Schicht: Kieselgel G (Merck)
Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

Dipeptid		R_F-Werte	
DL-Leucyl-L-leucin	(1)	0,58	0,49
L-Leucyl-L-leucin	(1a)	0,58	
D-Leucyl-L-leucin	(1b)		0,49
DL-Leucyl-L-tyrosin	(2)	0,55	0,44
L-Leucyl-L-tyrosin	(2a)	0,55	
D-Leucyl-L-tyrosin	(2b)		0,44
DL-Alanyl-L-leucin	(3)	0,56	0,30
L-Alanyl-L-leucin	(3a)	0,56	
DL-Leucyl-L-phenylalanin	(4)	0,38	0,27
L-Leucyl-L-phenylalanin	(4a)	0,4	
DL-Phenylalanyl-L-leucin	(5)	0,54	0,43
DL-Alanyl-L-valin	(6)	0,39	0,27
DL-Alanyl-DL-serin	(7)	0,19	0,13

Tabelle 1 Dünnschichtchromatographische Trennung einiger diastereomerer Dipeptide.

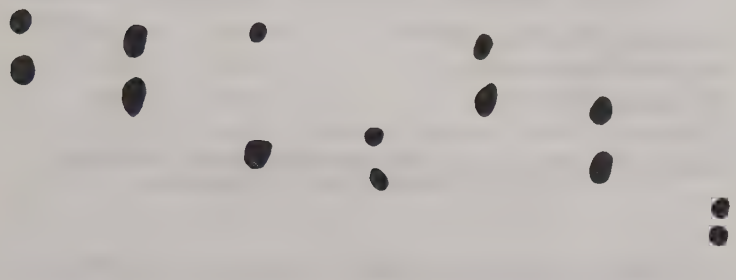

Abbildung 1 Dünnschichtchromatographische Trennung einiger diastereomerer Dipeptide mit dem Laufgemisch n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2. Die Zahlen entsprechen denen in Tabelle 1.

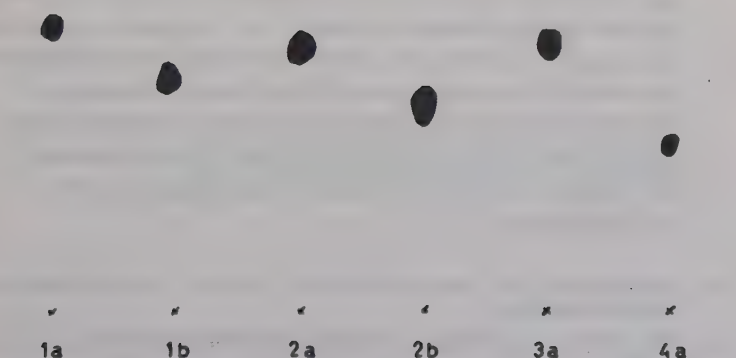

Abbildung 2 Dünnschichtchromatographische Trennung einiger diastereomerer Dipeptide. Bedingungen und Bezeichnungen wie in Abbildung 1.

b) Schicht: Cellulose MN 300 (Macherey und Nagel)
Laufgemisch: Essigester, Pyridin, Eisessig, Wasser 5:5:1:3 (vgl. Abb.18).

Dipeptid	R_p-Werte	
DL-Alanyl-DL-phenylalanin	0,59	0,56
DL-Alanyl-DL-norleucin	0,64	0,56
DL-Alanyl-DL-serin	0,23	0,16

Tabelle 2 Dünnschichtchromatographische Trennung einiger diastereomerer Dipeptide

c) Dünnschichtchromatographie geschützter Dipeptide:

Carbobenzoxy [x]-L-leucyl-L-phenylalaninäthylester und Z-D-Leucyl-L-phenylalaninäthylester ließen sich durch Besprühen mit n/10-Jodlösung und verd. Schwefelsäure auf der Platte nachweisen. Es konnte aber beim Chromatographieren mit verschiedenen Laufgemischen keine Trennung erzielt werden.

d) Bestimmung der unteren Nachweisgrenze:

Um feststellen zu können, in welcher Konzentration ein Dipeptid eben noch nachgewiesen werden kann, wurden steigende Konzentrationen von DL-Alanyl-L-leucin, DL-Leucyl-L-leucin und DL-Leucyl-L-tyrosin aufgetragen und mit dem Laufgemisch n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2 chromatographiert. Als geringste Konzentration konnten 0,2 Mikrogramm noch nachgewiesen werden, D-Alanyl-L-leucin allerdings nur bis 0,4 Mikrogramm.

e) Bestimmung der Nachweisbarkeit zweier Diastereomerer nebeneinander:

Um zeigen zu können, in welcher Konzentration ein Diastereomeres neben dem anderen eben noch nachge-

x) Der Carbobenzoxy-Rest wird weiterhin mit Z bezeichnet.

wiesen werden kann, wurden hohe Konzentrationen von L-Alanyl-L-leucin und sehr kleine von D-Alanyl-L-leucin aufgetragen. Nach dem Chromatographieren mit n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2 war es möglich, noch 0,5 Mikrogramm D-Alanyl-L-leucin neben 1000 Mikrogramm L-Alanyl-L-leucin mit Ninhydrin nachzuweisen.

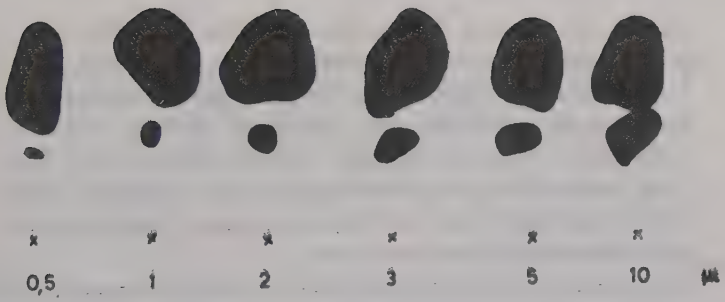

Abbildung 3 Bestimmung der geringsten Nachweisbarkeit zweier Diastereomerer nebeneinander. Fließmittel: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

2. Kolorimetrie:

S.STEIN und W.H.MOORE[58] untersuchten die Fähigkeit von Aminosäuren, mit Ninhydrin eine Blaufärbung zu geben, auf die Möglichkeit einer quantitativen Anwendung. Sie entwickelten ein gepuffertes Ninhydrinreagenz, das mit Dipeptiden eine blauviolette Farbe ergibt, deren Absorbtionsmaximum bei 570 mμ liegt. Es zeigte sich, daß das Reagenz trotz kühlen Aufbewahrens unter Stickstoff nach einiger Zeit verschiedene Werte lieferte. Außerdem färbten sich die Diastereomeren verschieden an, so wie das deutlich am L-Alanyl-L-leucin zu sehen ist. Dies war aber bei der Kolorimetrie der einzelnen Fraktionen einer Verteilung nicht entscheidend, da es hier auf den Verlauf der Kurve und nicht auf absolute Mengen ankam.

3. Säulenchromatographie:

Ausgehend von den Ergebnissen auf der Dünnschichtplatte wurde versucht, diastereomere Dipeptide über eine Säule zu trennen. Die Bedingungen wurden genau übertragen: die Säule mit Kieselgel gefüllt und mit n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2 eluiert. Der Verlauf wurde durch Kolorimetrieren der einzelnen Fraktionen bestimmt und die Trennung durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen.
DL-Leucyl-L-leucin zeigte eine geringe Trennung, während beim DL-Alanyl-L-leucin, das auch auf der Platte einen größeren R_F-Wert aufwies, zwei deutliche Maxima zu sehen sind. Aus dem Dünnschichtchromatogramm sieht man, daß L-Alanyl-L-leucin gut getrennt vorneweg läuft und dann das D-Alanyl-L-leucin folgt.

---

58) S.STEIN und W.H.MOORE, J. biol. Chemistry 176, 367 (1954).

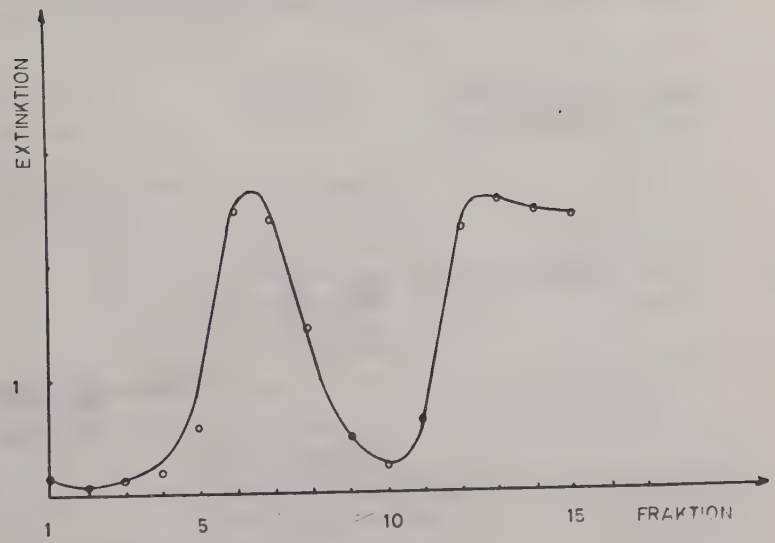

Abbildung 4 Kolorimetrisch bestimmte Kurve der Säulenchromatographie von DL-Alanyl-L-leucin.

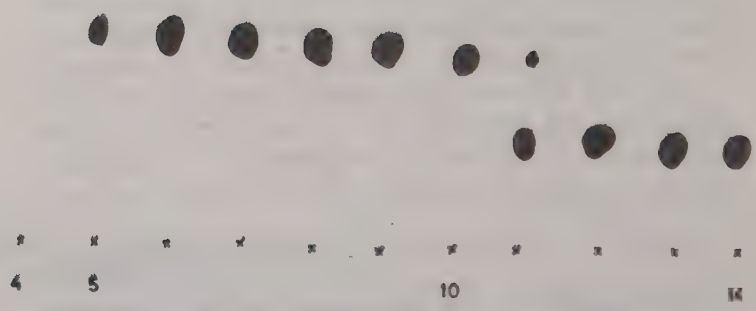

Abbildung 5 Dünnschichtchromatographische Analyse der säulenchromatographischen Trennung von DL-Alanyl-L-leucin. Fließmittel: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

4. Craigverteilung:

Es handelt sich um eine schubweise multiplikative Verteilung für die die einmalige Substanzzugabe am Anfang der Apparatur und die Anwendung einer stationären und einer bewegten Phase charakteristisch ist. Die Trennung diastereomerer Dipeptide ließ sich nach diesem Verfahren bei der Verwendung der geeigneten Phasen durchführen. Da sich Dipeptide durch Cyclisieren leicht verändern, ist es von Vorteil, daß diese Methode sehr schonend und ohne Hitze arbeitet. Durch Craigverteilung in Verbindung mit der dünnschichtchromatographischen Analyse konnte gezeigt werden, daß ein großer Teil der untersuchten Dipeptide mit ausreichenden R-Werten getrennt werden können (Tabelle 3).

Übersicht über die Craigverteilung von Dipeptiden:

Dipeptid	Phasen	Verteilungskoeffizient		ß-Wert
L-Leucyl-L-leucin	1. n-Butanol/ 0,5 proz.wässrige Lösung von geglühtem Natriumsulfat	0,35		
	2. n-Butanol, 2,5 proz. Amylol/Wasser			2,4
D-Leucyl-L-leucin	dto		0,86	
L-Leucyl-L-tyrosin	n-Butanol, 2,5 proz. Amylol/ 0,5 proz.wässrige Lösung von geglühtem Natriumsulfat	0,3		1,7
D-Leucyl-L-tyrosin	dto		0,5	
DL-Leucyl-L-phenylalanin	n-Butanol/n-Natriumphosphatlösung	1,03	1,5	1,45
DL-Phenylalanyl-L-leucin	dto	0,85	1,7	2,0
DL-Alanyl-L-leucin	dto	0,04	0,1	2,5
DL-Alanyl-L-valin	dto	keine Trennung		

Tabelle 3 Übersicht über die Craigverteilung diastereomerer Dipeptide.

Gleichzeitig mit der Trennung konnte auch eine Reinheitsprüfung der Substanz vorgenommen werden. Ist diese rein, so muß der berechnete Gehalt jeder Fraktion mit dem experimentell gefundenen übereinstimmen.
Bei der Synthese von DL-Leucyl-L-leucin fiel während der Hydrierung annähernd reines L-Leucyl-L-leucin aus und ein Gemisch aus L-Leucyl-L-leucin und D-Leucyl-L-leucin blieb in Lösung. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus Alkohol wurde versucht, die beiden Diastereomeren rein zu erhalten. Um den Nachweis darüber zu führen wurden beide mit den Phasen n-Butanol/ Wasser unter gleichen Bedingungen verteilt:

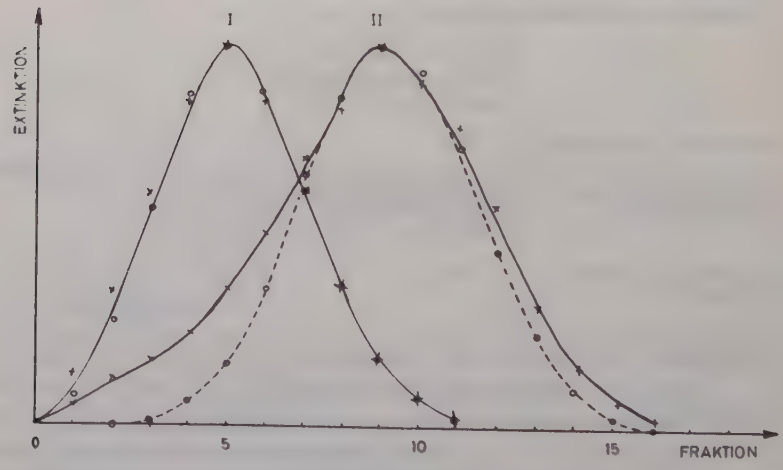

Abbildung 6 Verteilungskurven von L-Leucyl-L-leucin (I) und D-Leucyl-L-leucin (II). x sind die experimentell gefundenen, o die berechneten Werte. Phasen: n-Butanol/Wasser.

Beim L-Leucyl-L-leucin stimmt die experimentell gefundene mit der berechneten Kurve überein; es liegt also Reinsubstanz vor. D-Leucyl-L-leucin ist mit wenig

L-Leucyl-L-leucin verunreinigt.
Mit der Craigverteilung ist man auch in der Lage, Reaktionsnebenprodukte abzutrennen und zu identifizieren. Bei der Verteilung von DL-Leucyl-L-phenylalanin mit den Phasen n-Butanol/n-Natriumphosphatlösung zeigte sich in Element 2 und 11 ein Maximum:

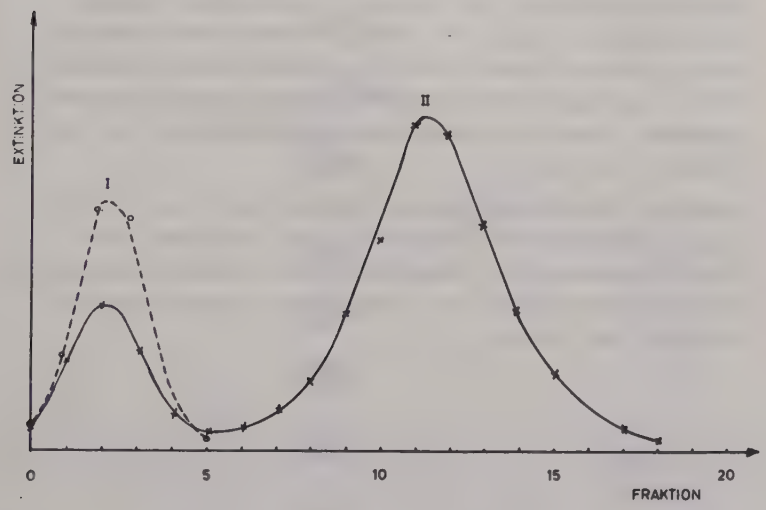

Abbildung 7 Verteilungskurven von DL-Leucyl-L-phenylalanin (II) und DL-Leucin (I). Phasen: n-Butanol/n-Natriumphosphatlösung.

Es lag der Verdacht nahe, daß das erste Maximum von einer Verunreinigung durch eine freie Aminosäure herrührt, die mit Ninhydrin eine wesentlich stärkere Färbung gibt als das Peptid. Es wurde daher reines DL-Leucin unter genau gleichen Bedingungen verteilt und es zeigte sich, daß die Verteilungskurve von DL-Leucin mit dem ersten Maximum der Verteilungskurve von DL-Leucyl-L-phenylalanin identisch ist.

Im Dünnschichtchromatogramm (vgl. Abb.22) ist eine Trennung in die Diastereomeren in Kurve II sichtbar.

Bei der Verteilung von DL-Alanyl-L-leucin wurde mit allen Lösungsmittelsystemen ein sehr niedriger Verteilungskoeffizient gefunden, da diese Substanz gut wasserlöslich ist. Nach der Verteilung mit den Phasen n-Butanol/n-Natriumphosphatlösung konnte dünnschichtchromatographisch eine geringe Auftrennung festgestellt werden (vgl. Abb. 26). In einer zwanzigstufigen Apparatur wurden 149 Verteilungsschritte durchgeführt und damit das Dipeptid in seine Diastereomeren getrennt, was im Dünnschichtchromatogramm gut zu sehen ist (Abb.8).

Auch das DL-Alanyl-DL-valin zeigte einen sehr niedrigen Verteilungskoeffizienten, sodaß auch hier 149 Verteilungsschritte ausgeführt wurden. Das Dünnschichtchromatogramm zeigt aber, daß keine Trennung stattgefunden hat (Abb.9).

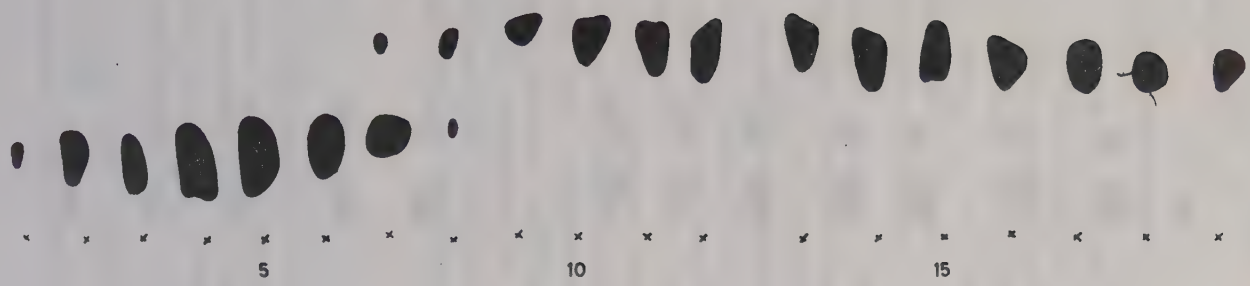

Abbildung 8 Dünnschichtchromatographie der Verteilung von DL-Alanyl-L-leucin. 149 Verteilungsschritte in einer zwanzigstufigen Apparatur. Phasen: n-Butanol/n-Natriumphosphatlösung. Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

Abbildung 9 Dünnschichtchromatographie der Verteilung von DL-Alanyl-DL-valin. 149 Verteilungsschritte in einer zwanzigstufigen Apparatur. Phasen: n-Butanol/n-Natriumphosphatlösung. Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

III. Präparative Verteilung

1. L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid:

Hier gelang es über eine präparative Verteilung die meist gut wasserlöslichen Nebenprodukte und nicht umgesetzte Substanz aus dem Rohprodukt der Synthese zu entfernen. Es wurde mit den Phasen Petroläther (50–70°), Essigester 1:1/Methanol, Wasser 1:1 über eine Kolonne verteilt und die leichte Phase in Fraktionen abgenommen. Reinsubstanz befand sich in Fraktion 0 und 1.

Über vier Kolonnen wurde das reine Amid verteilt, um zu sehen, ob wie bei den Dipeptiden eine Trennung in die Diastereomeren zu erzielen ist. Als Phasen wurden Petroläther (50–70°), Essigester 8:2/Methanol, Wasser 6,5 : 3,5 verwendet und die Drehung der Substanz in den einzelnen abgenommenen Fraktionen bestimmt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede. Weiterhin wurde Substanz aus der leichten und der schweren Phase in einer Craigapparatur unter gleichen Bedingungen verteilt und es ergaben sich zwei identische Verteilungskurven. Es war also nicht möglich, L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid in seine Diastereomeren zu trennen, was sich darauf zurückführen läßt, daß keine inneren Salze und keine intramolekularen Beziehungen ausgebildet werden können.

2. DL-Leucyl-L-leucin:

Nachdem es möglich war, diastereomere Dipeptide auf einer Craigapparatur zu verteilen, sie quantitativ durch Kolorimetrie zu bestimmen und die Trennung dünnschichtchromatographisch nachzuweisen, wurde nun auf einer nach dem VAN DIJCK-Prinzip[59)60)] arbeitenden

59) W.J.D. VAN DIJCK und A.H.RUYS, Perfum. essent. Oil. Rec. 28, 91 (1937).

60) E.HECKER und K.ALLEMANN, Angew.Chem. 66, 557 (1954).

Apparatur verteilt. Es ist dabei möglich, die Substanz kontinuierlich in der Mitte zuzugeben und links und rechts die reinen Diastereomeren abzunehmen.

Es wurde DL-Leucyl-L-leucin mit den Phasen n-Butanol, 2,5% Amylalkohol/Wasser verteilt und die Trennung durch die physikalischen Daten wie Äquivalentgewicht, Schmelzpunkt und Drehung nachgewiesen. Als Reinheitsprüfung wurde Substanz aus dem Maximum der leichten und der schweren Phase mit dem gleichen Lösungsmittelsystem unter gleichen Bedingungen in einer Craigapparatur verteilt:

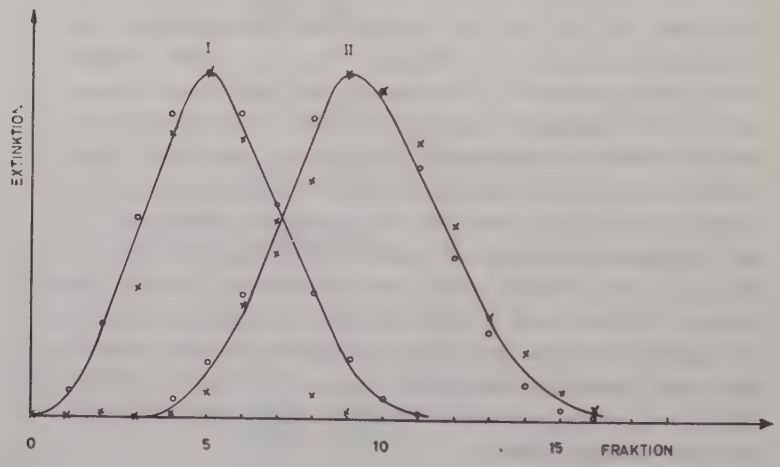

Abbildung 10 Verteilungskurven von L-Leucyl-L-leucin (I) und D-Leucyl-L-leucin (II) nach ihrer Trennung durch präparative Gegenstromverteilung. Phasen: n-Butanol, 2,5% Amylalkohol/Wasser. x sind die gefundenen, o die berechneten Werte.

Die berechnete und die experimentell gefundene Kurve stimmen genau überein. Außerdem wurde die Reinheit der Substanzen durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen.

Damit wurde gezeigt, daß die Gegenstromverteilung geeignet ist, diastereomere Dipeptide im präparativen Maßstab zu trennen.

Experimenteller Teil

I. Synthesen

1. L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid:

L-Leucinäthylester-HCl[61]:

80 g L-Leucin wurden in 500 ml abs. Äther suspendiert und Salzsäuregas eingeleitet. Die Substanz löste sich, es wurde 2 Stunden am Rückflußkühler erhitzt und dann das Reaktionswasser durch Erhitzen der Substanz im Vakuum entfernt. Die Substanz wurde in abs. Alkohol aufgenommen und der Vorgang wiederholt. Nach erneutem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der L-Leucinäthylester-HCl aus Aceton-Äther umkristallisiert. Schmelzpunkt[x]: 135°, Ausbeute: theor.119 g, prakt.107 g (90% d. Th.).

L-Leucinäthylester:

98 g L-Leucinäthylester-HCl wurden in 300 ml abs.Tetrahydrofuran gelöst, unter Eiskühlung und Rühren während 10 Min. 50,8 g Triäthylamin zugetropft und noch eine halbe Stunde weitergerührt. Triäthylammonchlorid fiel aus, das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der zurückbleibende L-Leucinäthylester gleich auf L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid weiterverarbeitet.

Ausbeute: theor. 65 g.

L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid:

76 g Mandelsäure wurden in 500 ml abs.Tetrahydrofuran

---

x) Alle Schmelzpunkte wurden im Aluminiumblock bestimmt und sind nicht korrigiert.

61) F.RÖHMAN, Ber.dtsch.chem.Ges. 30, 1978 (1897).

gelöst, 50,4 g Triäthylamin zugegeben und im Eis-Kochsalzbad auf -10° gekühlt. Unter kräftigem Rühren wurden 54 g Chlorameisensäureäthylester zugetropft, wobei die Temperatur -4° nicht überschreiten darf. Nach 30 Min. Rühren wurde der L-Leucinäthylester in abs. Tetrahydrofuran langsam zugegeben und noch 5 Stunden bei Zimmertemperatur weitergerührt. Das ausgefallene Triäthylammonchlorid wurde abgesaugt, mit abs. Tetrahydrofuran ausgewaschen und dann das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Die Substanz wurde in Essigester aufgenommen, mit n/10-HCl, gesättigter Natriumkarbonatlösung und Wasser gewaschen, über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und der Essigester im Vakuum abdestilliert. Das L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid blieb als gelbliches Öl zurück. Diese Substanz wurde durch Verteilung weiter gereinigt; vgl. hierzu S. 75.

Ausbeute: theor. 146 g, prakt. 90,3 g (62% d.Th.)

Drehung: Einwaage 0,1849 g in Methanol, 10 cm Küvette,

$$\text{Hg } 436,\ \alpha = -1{,}36^{\circ},\ [\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg } 436} = -73{,}5^{\circ}$$

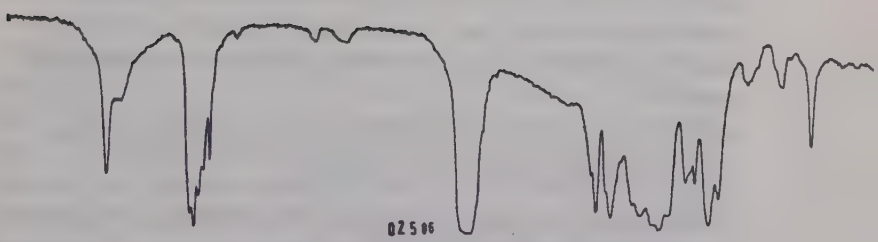

Abbildung 11 IR-Spektrum[x)] von L-Leucyläthylester-DL-mandelsäureamid

x) IR-Spektren wurden mit einem Beckman Spektralphotometer IR 4 bzw. IR 8 aufgenommen.

2. DL-Leucyl-L-leucin:

Z-DL-Leucin[34)62)63)]:

Zu einer Lösung von 4,4 g DL-Leucin in 20 ml 2n-NaOH wurden unter starkem Rühren 5,7 g Carbobenzoxychlorid und 8,3 ml 4n-NaOH innerhalb von 20 bis 25 Min. zugetropft. 10 Min. wurde noch weitergerührt, sofort ausgeäthert und dann unter Eiskühlung mit konz. Salzsäure bis zum Farbumschlag von Kongorot angesäuert. Der entstandene Niederschlag wurde mit Äther ausgeschüttelt, über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und dann der Äther im Vakuum abdestilliert. Das Z-DL-Leucin blieb als Sirup zurück. Ein Teil der Substanz war über längere Zeit im Kühlschrank und kristallisierte.

Schmelzpunkt: 50° (Lit.52-54°), Ausbeute: theor. 8,8 g, prakt. 7,6 g (86% d.Th.).

L-Leucinbenzylester-p-toluolsulfonat[64)]:

6,6 g L-Leucin, 21,6 g Benzylalkohol, 9,7 g p-Toluolsulfonsäure. H_2O und 40 ml Benzol wurden eine Stunde am Rückflußkühler erhitzt. Es entstand schon bald eine klare Lösung. Das Reaktionswasser wurde durch eine azeotrope Destillation entfernt. Nachdem kein Wasser mehr überdestillierte, wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt, Äther zugegeben, einige Stunden im Kühlschrank stehen gelassen und das ausgefallene L-Leucinbenzylester-p-toluolsulfonat abfiltriert. Dieses wurde mit Äther ausgewaschen und aus Methanol-Äther umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 158° (Lit.158,5-160°), Ausbeute: theor. 20,7 g, prakt. 16,8 g (81% d.Th.).

---

62) S.W.FOX, M.FLING, H.WAX und C.W.PETTINGA, J.Amer. chem. Soc. 72, 1862 (1950).

63) W.GRASSMANN und E.WÜNSCH, Chem.Ber. 91, 462 (1958).

64) L.ZERVAS, M.WINITZ und J.P.GREENSTEIN, J.org. Chemistry 22, 1515 (1957).

L-Leucinbenzylester[65]:

15 g L-Leucinbenzylester-p-toluolsulfonat wurden in 58 ml Chloroform suspendiert, auf 0 bis -5° gekühlt und unter Rühren während 10 Min. 3,8 g Triäthylamin zugetropft, wobei sich die Substanz löste. Bei -3° wurde noch 15 Min. weitergeführt, 190 ml abs. Äther zugegeben und 15 Min. stehen gelassen. Das ausgefallene Triäthylammon-p-toluolsulfonat wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der L-Leucinbenzylester blieb als gelbliches Öl zurück und wurde sofort weiterverarbeitet.

Ausbeute: theor. 8,1 g, prakt. 5,7 g (71% d.Th.).

Z-DL-Leucyl-L-leucinbenzylester:

Das Dipeptid wurde nach der gemischten Anhydridmethode[48)49)50)] hergestellt.
6,8 g Z-DL-Leucin wurde in 38 ml abs.Tetrahydrofuran gelöst, 3,6 g Triäthylamin zugegeben und im Eis-Kochsalzbad auf -12° gekühlt. Dann wurden bei dieser Temperatur 2,5 g Chlorameisensäureäthylester zugetropft, noch 5 Min. weitergerührt und 5,6 g L-Leucinbenzylester in 40 ml abs. Tetrahydrofuran langsam zugegeben. 90 Min. wurde bei 0° und dann über Nacht bei +4 bis +8° weitergerührt. Das ausgefallene Triäthylammonchlorid wurde abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in 60 ml Essigester aufgenommen und in der Kälte einmal mit 7 ml Wasser, dreimal mit 5 ml n-HCl, einmal mit 7 ml Wasser, dreimal mit 7 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung und zweimal mit 7 ml Wasser ausgewaschen. Die Essigesterschicht wurde über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der zurückbleibende Z-DL-Leucyl-L-leucinbenzylester wurde hydriert.

---

65) K.MILLER und H.WÄLSCH, J.Amer.chem.Soc. 74, 1092 (1952).

DL-Leucyl-L-leucin:

Der Z-DL-Leucyl-L-leucinbenzylester wurde in 100 ml Methanol aufgenommen und der Carbobenzoxy-Rest und der Benzylester mit Palladiummohr[x)] als Katalysator bei Zimmertemperatur und Normaldruck abhydriert. Die Hydrierung erfolgte in einer Schüttelente, die mit einem Niveaugefäß verbunden ist, an dem der Verbrauch an Wasserstoff abgelesen werden kann.

Beim DL-Leucyl-L-leucin zeigte sich, nachdem die Hydrierung einige Zeit lief, daß Substanz ausfiel; diese wurde abfiltriert, zweimal aus 90 proz. Alkohol umkristallisiert und im Vakuumexsiccator getrocknet.
Das Methanol wurde im Vakuum abdestilliert, der Rückstand zweimal aus 96 proz. Alkohol umkristallisiert und ebenfalls im Vakuumexsiccator getrocknet.

Äquivalentgewicht[xx)]:

1. Ausgefallene Substanz:
   Einwaage 0,092 g, Verbrauch an n/10-KOH 3,54 ml, Äquivalentgewicht 260.

2. Substanz aus Methanol:
   Einwaage 0,127 g, Verbrauch an n/10-KOH 4,6 ml, Äquivalentgewicht 276.

Das theoretische Äquivalentgewicht von Leucyl-leucin

---

x) Herstellung des Katalysators Palladiummohr[36)]:
1 g Palladiumchlorid wird in 50 ml n-HCl und 40 ml Wasser gelöst, mit 7,1 ml 33 proz. Formaldehyd versetzt und auf -10° gekühlt. Unter starkem Rühren tropft man 14 ml 50proz. Kalilauge in 10 Min.zu, wobei sich die Temperatur zwischen 0 und 3° bewegt. Es wird noch 15 Min. auf 60° erwärmt, wobei sich der Palladiummohr absetzt. Dieser wird durch wiederholtes Dekantieren mit Wasser gut ausgewaschen.

xx) Bestimmung des Äquivalentgewichtes:
Das Dipeptid wurde in wenig heißem Wasser aufgenommen, eine neutralisierte Mischung gleicher Teile Dimethylformamid und abs. Alkohol zugegeben und mit n/10-KOH gegen Thymolblau titriert.

beträgt 244. Wie aber E.FISCHER[66] gezeigt hat, enthalten die Leucyl-leucine 2 bis 2,5 Mol Kristallwasser.

Drehung[x] und Schmelzpunkt:

1. Ausgefallene Substanz:

   Einwaage 0,126 g in 10 ml n-NaOH, Hg 578, 10 cm Küvette, $\alpha = -0,17^\circ$, $[\alpha]^{20^\circ}_{\text{Hg 578}} = -13,5^\circ$. Bezieht man diesen Wert auf wasserfreie Substanz, so beträgt er $[\alpha]^{20^\circ}_{\text{Hg 578}} = -14,4^\circ$.

   Messung bei Na-Licht: $\alpha = -0,16_5^\circ$, $[\alpha]^{20^\circ}_{D} = -13^\circ$, bezogen auf wasserfreie Substanz $[\alpha]^{20^\circ}_{D} = -13,9^\circ$.

   Schmelzpunkt: 262°.

2. Substanz aus Methanol:

   Einwaage 0,125 g in 10 ml n-HCl, Hg 578, 10 cm Küvette, $\alpha = -0,76^\circ$, $[\alpha]^{20^\circ}_{\text{Hg 578}} = -61^\circ$, bezogen auf wasserfreie Substanz $[\alpha]^{20^\circ}_{\text{Hg 578}} = -69^\circ$.

   Messung bei Na-Licht: $\alpha = -0,75^\circ$, $[\alpha]^{20^\circ}_{D} = -59,5^\circ$, bezogen auf wasserfreie Substanz $[\alpha]^{20^\circ}_{D} = -67,3^\circ$.

   Schmelzpunkt: 272°.

Es zeigt sich also, daß bei der Hydrierung fast reines L-Leucyl-L-leucin[66] ausfällt. Die Substanz aus Methanol besitzt nach zweimaligem Umkristallisieren annähernd

---

x) Drehungen wurden mit einem Leitz E-Polarimeter bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt. Die Temperatur betrug 20°.

66) E.FISCHER, Ber.dtsch.chem.Ges. 39, 2893 (1906).

die physikalischen Daten des D-Leucyl-L-leucins[67]. Eine weitere Reinheitsprüfung wurde durch Verteilung vorgenommen; vgl. hierzu S. 26.

Ausbeute: theor. 3,75 g, prakt. 1. ausgefallene Substanz 0,9 g, 2. Substanz aus Methanol 1,4 g, zusammen 2,3 g (61% d.Th.).

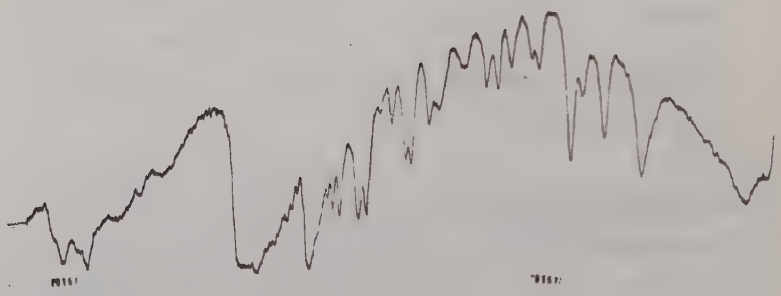

Abbildung 12 IR-Spektrum von L-Leucyl-L-leucin

---

67) E.FISCHER und A.H.KOELKER, Liebigs Ann.Chem. 354, 39 (1907).

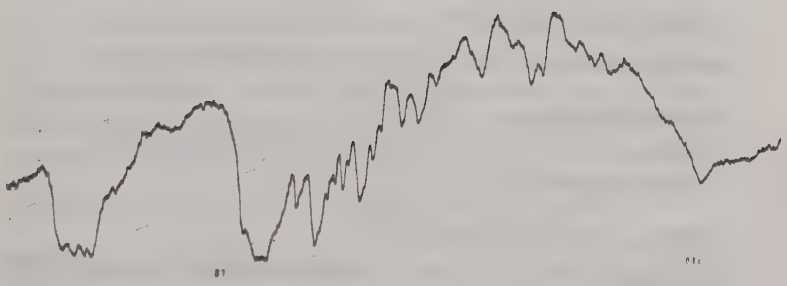

Abbildung 13 IR-Spektrum von D-Leucyl-L-leucin

3. L-Leucyl-L-leucin:

Als Vergleichssubstanz wurde L-Leucyl-L-leucin nach der Dicyclohexylcarbodiimidmethode[29] hergestellt.

6,6 g Z-L-Leucin, 5,5 g L-Leucinbenzylester und 8 g Dicyclohexylcarbodiimid wurden in 100 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und bei Zimmertemperatur 16 Stunden stehen gelassen. Es fiel Dicyclohexylharnstoff aus, der abfiltriert wurde. Dann wurde 0,2 ml Eisessig zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und in der Kälte wie bereits bei der Synthese von DL-Leucyl-L-leucin beschrieben, ausgewaschen. Die Essigesterschicht wurde über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und dann im Vakuum abdestilliert. Es blieb der Z-L-Leucyl-L-leucinbenzylester zurück.

Ausbeute: theor. 11,7 g, prakt. 7,5 g (64% d.Th.).

L-Leucyl-L-leucin wurde durch Hydrieren des Z-L-Leucyl-L-leucinbenzylesters mit Palladiummohr erhalten. Auch hier fiel ein Teil der Substanz aus. Die ausgefallene und die im Methanol in Lösung gebliebene Substanz wurde aus 96 proz. Alkohol umkristallisiert und im Vakuumexsiccator getrocknet.

Ausbeute: theor. 3,9 g, prakt. 3 g (77% d.Th.).

Äquivalentgewicht:
Einwaage 0,116 g, Verbrauch an n/10-KOH 4,24 ml, Äquivalentgewicht 263.

Drehung und Schmelzpunkt:

Einwaage 0,1761 g in 10 ml n-HCl, Hg 578, 10 cm Küvette,

$\alpha = + 0{,}02^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg } 578} = + 1{,}13^{\circ}$.

Schmelzpunkt: 264°.

4. DL-Leucyl-L-phenylalanin:

L-Phenylalaninbenzylester-p-toluolsulfonat[64]:
5,5 g L-Phenylalanin, 14 g Benzylalkohol, 6,5 g p-Toluolsulfonsäure und 50 ml Benzol wurden eine Stunde am Rückflußkühler erhitzt. Das Reaktionswasser wurde durch eine azeotrope Destillation entfernt, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt, 200 ml Äther zugegeben und einige Stunden in den Kühlschrank gestellt. Das ausgefallene L-Phenylalaninbenzylester-p-toluolsulfonat wurde abfiltriert und aus Methanol-Äther umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 171° (Lit.170,5 - 171,5°).

Ausbeute: theor. 14,8 g, prakt. 14 g (94,5% d.Th.).

L-Phenylalaninbenzylester:
7,4 g L-Phenylalaninbenzylester-p-toluolsulfonat wurden in 20 ml Chloroform suspendiert, auf -5° gekühlt

und mit Triäthylamin der freie Ester dargestellt (vgl. S. 37).

Ausbeute: theor. 4,2 g, prakt. 2 g (48% d.Th.).

Z-DL-Leucyl-L-phenylalaninbenzylester:

2 g L-Phenylalaninbenzylester, 2 g Z-DL-Leucin und 1,8 g Dicyclohexylcarbodiimid wurden in 100 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und bei Zimmertemperatur 120 Stdn. stehen gelassen. Die Aufarbeitung erfolgte wie bereits beschrieben.

Ausbeute: theor. 3,8 g, prakt. 2,3 g (60,5% d.Th.).

DL-Leucyl-L-phenylalanin:

Durch Hydrieren des Z-DL-Leucyl-L-phenylalaninbenzylesters mit Palladiummohr in Methanol wurde das Dipeptid kristallin erhalten.

Ausbeute: theor. 1,3 g, prakt. 0,9 g (69% d.Th.).

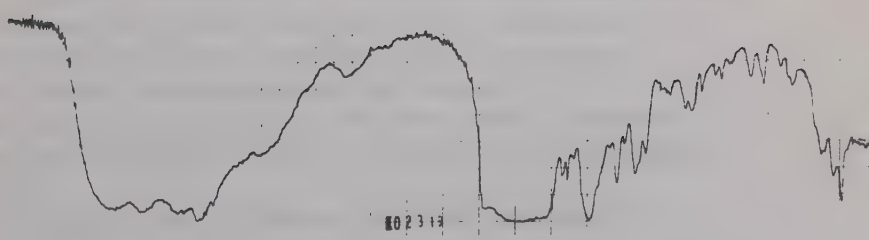

Abbildung 14 IR-Spektrum von DL-Leucyl-L-phenylalanin.

5. DL-Phenylalanyl-L-leucin:

Z-DL-Phenylalanin[34]:

Zu einer Lösung von 3,3 g DL-Phenylalanin in 10 ml 2n-NaOH wurden unter starkem Rühren 3,4 g Carbobenzoxychlorid und 5 ml 4n-NaOH zugetropft und das Z-DL-Phenylalanin wie üblich dargestellt.

Ausbeute: theor. 6 g, prakt. 4,5 g (75% d.Th.).

Z-DL-Phenylalanin-L-leucinbenzylester:

3,9 g Z-DL-Phenylalanin wurden in 20 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst, 1,34 g Triäthylamin zugegeben und auf -7° gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 1,44 g Chlorameisensäureäthylester zugetropft, noch 45 Min. weitergerührt und 2,9 g L-Leucinbenzylester in 15 ml abs. Tetrahydrofuran zugetropft. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie bereits beschrieben (S. 37).

Ausbeute: theor. 6,5 g, prakt. 3 g (46% d.Th.).

DL-Phenylalanyl-L-leucin:

Das Dipeptid wurde durch Hydrieren des Z-DL-Phenylalanin-L-leucinbenzylesters mit Palladiummohr in Methanol erhalten. Es wurde aus Methanol-Petroläther ($100-120^{\circ}$) umkristallisiert.

Ausbeute: theor. 1,3 g, prakt. 0,9 g (69% d.Th.).

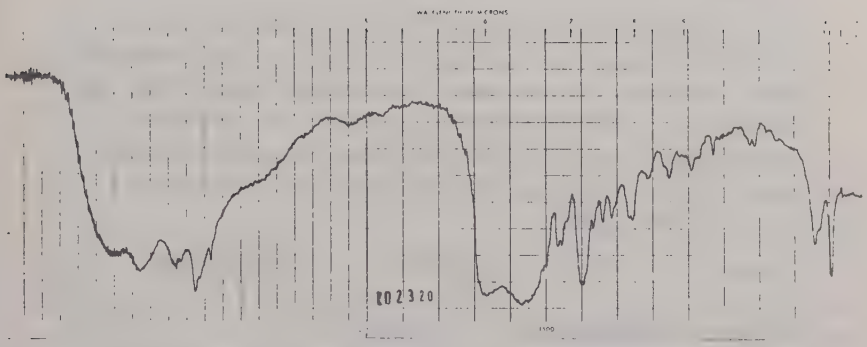

Abbildung 15 IR-Spektrum von DL-Phenylalanyl-L-leucin

6. Z-L-Leucyl-L-phenylalaninäthylester:

L-Phenylalaninäthylester.HCl[68)69)]:

Durch eine Suspension von 4 g L-Phenylalanin in 50 ml abs. Äthanol wurde eine Stunde Salzsäuregas geleitet und dann nochmals 50 ml abs. Alkohol zugegeben, wobei sich die Substanz löste. Zwei Stunden wurde am Rückflußkühler erhitzt, die Lösung im Vakuum eingeengt, 50 ml Benzol zugegeben und das Reaktionswasser durch eine azeotrope Destillation entfernt. Das Lösungsmittel wurde dann im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in abs. Äthanol aufgenommen und der Vorgang wiederholt. Nach der Umkristallisation aus Azeton/Äther wurde das L-Phenylalaninäthylester.HCl als weiße Kristalle erhalten.

---

68) E.FISCHER und W.SCHÖLLER, Liebigs Ann.Chem. 357, 1 (1907).

69) E.FISCHER, Ber.dtsch.chem.Ges. 34, 433 (1901).

Schmelzpunkt: 153°.

Ausbeute: theor. 5,6 g, prakt. 5,2 g (93% d.Th.).

L-Phenylalaninäthylester[70]:

2,3 g L-Phenylalaninäthylester.HCl wurden in 5 ml Methanol gelöst und unter Rühren mit 1,0 g Triäthylamin versetzt. 100 ml abs. Äther wurden zugesetzt, eine Stunde im Eis-Kochsalzbad gekühlt, das Triäthylammonchlorid abfiltriert, mit Äther ausgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der freie Ester blieb als Öl zurück.

Ausbeute: theor. 1,94 g, prakt. 1,9 g (98% d.Th.).

Z-L-Leucyl-L-phenylalaninäthylester[71]:

Die Darstellung erfolgte nach der Dicyclohexylcarbodiimidmethode[29]:
2,65 g Z-L -Leucin, 1,9 g L-Phenylalaninäthylester und 2,3 g Dicyclohexylcarbodiimid wurden in 100 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und bei Zimmertemperatur 18 Stdn. stehen gelassen. 0,1 ml Eisessig wurden zugegeben, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen, mit 0,1 n-HCl, gesättigter Natriumcarbonatlösung und Wasser ausgewaschen, über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum bis fast zur Trockne eingedampft. Nach Zusatz von Petroläther (100-120°) kristallisierte der Z-L-Leucyl-L-phenylalaninäthylester über Nacht aus.
Schmelzpunkt: 113°.
Drehung: Einwaage 0,0722 g in 10 ml abs. Äthanol,

Hg 578, 10 cm Küvette, $\alpha = -0{,}18^{\circ}$, $[\alpha]_{20^{\circ}}^{Hg\ 578} = -24{,}9$

---

70) R.W.CHAMBERS und F.H.CARPENTER, J.Amer.chem.Soc. 77, 1524 (1955).

71) E.L.SMITH, D.H.SPACKMAN und W.J.POLGLASE, J.biol. Chemistry 199, 801 (1952).

Ausbeute: theor. 4,4 g, prakt. 3 g (70% d.Th.).

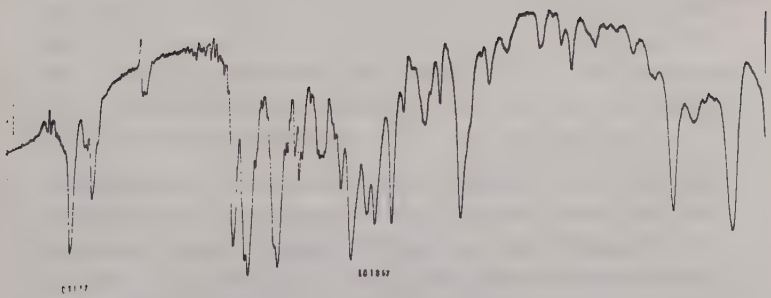

Abbildung 16 IR-Spektrum von Z-L-Leucyl-L-phenylalanin-äthylester.

7. Z-D-Leucyl-L-phenylalaninäthylester:

Die Synthese wurde entsprechend der von Z-L-Leucyl-L-phenylalaninäthylester durchgeführt.

Schmelzpunkt: 101°.

Drehung: Einwaage 0,1099 g in 10 ml abs.Äthanol, Hg 578, 10 cm Küvette, α = + 0,12°, $[\alpha]^{20°}_{Hg\ 578}$ = + 10,9°.

Elementaranalyse[x]:

3,304 mg Substanz, 8,24 mg CO_2, 2,18 mg H_2O

2,501 mg Substanz, 0,38 cm^3 N_2 (24°, 750 mm)

3,685 mg Substanz, 4,98 cm^3 n/50-$Na_2S_2O_3$

$C_{25}H_{32}N_2O_5$ (400)	ber.	C 68,1	gef. C 68,06
		H 7,3	H 7,38
		N 6,36	N 6,26
		O 18,1	O 18,02

Ausbeute: theor. 4,4 g, prakt. 2,8 g (64% d.Th.).

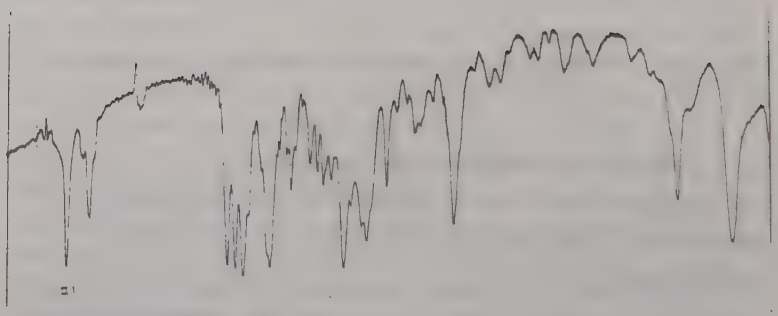

Abbildung 17 IR-Spektrum von Z-D-Leucyl-L-phenylalanin-äthylester.

---

x) Die Analyse übernahm das mikroanalytische Labor Alfred Bernhardt, Mülheim/Ruhr.

II. Analytik

1. Dünnschichtchromatographie:

Es wurden Platten in der Größe 20 mal 20 cm verwendet. Diese wurden mit Chromschwefelsäure gereinigt, auf eine Schablone gelegt und mit einem Streichgerät der Firma Desaga[72] beschichtet.

Schichten:

a) Kieselgel G nach Stahl (Merck): Nach dem Auftragen der Schicht blieben die Platten an der Luft liegen, bis ihre Oberfläche matt geworden war. Dann wurden sie im Trockenschrank etwa 30 Min. bei 110° getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden sie bis zur Benutzung im Exsiccator aufbewahrt.

b) Cellulose MN 300 (Macherey und Nagel): Um eine glatte Schicht zu erhalten, wurde die Cellulose mit der vorgeschriebenen Menge Wasser in einem Mixgerät eine Min. lang homogenisiert. Die bestrichenen Platten wurden 10 Min. bei 110° getrocknet.

Laufmittel:

Es wurde a) n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:2
b) n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:4
c) Essigester, Wasser, Eisessig, Pyridin 5:3:1:5
d) n-Butanol, Eisessig, 5proz. Ammoniak, Wasser 6:1:1:2

verwendet.

Durchführung der Chromatographie:
Die Substanzen wurden 1,5 cm vom unteren Rand der Platte entfernt im Abstand von 1,5 bis 2 cm aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 10 bis 12 cm. Die Platten wurden aus der Trennkammer herausgenommen und an der Luft oder im Trockenschrank bei etwa 80° getrocknet.

---

72) E.STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958).

Nachweis:

Die Platten wurden mit Ninhydrin (Merck Sprühreagenz) besprüht und in einen Trockenschrank von 110° gebracht. Zum Nachweis von Dipeptiden mit Schutzgruppen eignet sich ein Reagenz aus gleichen Teilen n/10-Jodlösung und verd. Schwefelsäure. Sie färben sich damit gelbbraun an.

Chromatographieren verschiedener Dipeptide:

a) Schicht: Kieselgel G
Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.
Es wurden die Dipeptide DL-Leucyl-L-leucin, DL-Leucyl-L-tyrosin, DL-Alanyl-L-leucin, DL-Leucyl-L-phenylalanin, DL-Phenylalanyl-L-leucin, DL-Alanyl-L-valin und DL-Alanyl-DL-serin getrennt (vgl. Abb.1).

b) Unter den gleichen Bedingungen wie bei a) wurden folgende Diastereomeren chromatographiert:
L-Leucyl-L-leucin, D-Leucyl-L-leucin, L-Leucyl-L-tyrosin, D-Leucyl-L-tyrosin, L-Alanyl-L-leucin, L-Leucyl-L-phenylalanin. Die R_F-Werte waren mit den bei a) gefundenen identisch (vgl. Abb.2).

c) Schicht: Kieselgel G
Laufgemisch: n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:4.
Es ergaben sich hier etwas größere R_F-Werte:

DL-Alanyl-L-valin	0,47	0,42
DL-Alanyl-DL-serin	0,27	0,22

d) Schicht: Cellulose MN 300 (Macherey und Nagel)
Laufgemisch: Essigester, Pyridin, Eisessig, Wasser 5:5:1:3.

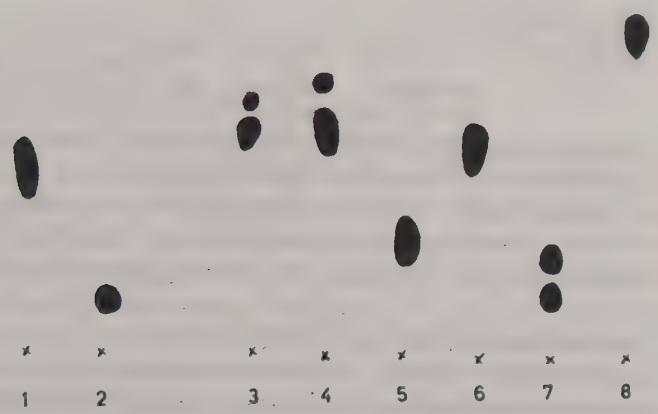

Abbildung 18 Dünnschichtchromatogramm verschiedener Dipeptide mit dem Laufgemisch Essigester, Pyridin, Eisessig, Wasser 5:5:1:3 auf einer Celluloseplatte. Die Zahlen entsprechen denen in Tabelle 4.

Dipeptid			
DL-Alanyl-DL-methionin	(1)	0,43	
DL-Alanyl-DL-asparagin	(2)	0,12	
DL-Alanyl-DL-phenylalanin	(3)	0,59	0,56
DL-Alanyl-DL-norleucin	(4)	0,64	0,56
DL-Alanyl-DL-alanin	(5)	0,28	
DL-Alanyl-DL-valin	(6)	0,51	
DL-Alanyl-DL-serin	(7)	0,23	0,16
DL-Leucyl-L-leucin	(8)	0,77	

Tabelle 4 Dünnschichtchromatographie einiger Dipeptide. Laufgemisch: Essigester, Pyridin, Eisessig, Wasser 5:5:1:3. Schicht: Cellulose MN 300 (Macherey und Nagel).

Unter diesen Bedingungen konnten DL-Alanyl-DL-phenylalanin, DL-Alanyl-DL-norleucin und DL-Alanyl-DL-serin in ihre Diastereomeren getrennt werden.

e) Schicht: Kieselgel G

Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2

n-Butanol, Eisessig, 5proz. Ammoniak, Wasser 6:1:1:2.

Z-L-Leucyl-L-phenylalaninäthylester und Z-D-Leucyl-L-phenylalaninäthylester wurde mit beiden Laufgemischen chromatographiert und mit einem Gemisch aus n/10-Jodlösung und verd. Schwefelsäure besprüht. Es ergaben sich für beide Substanzen gleiche R_F-Werte.

f) Bestimmung der unteren Nachweisgrenze:

Am DL-Alanyl-L-leucin, DL-Leucyl-L-leucin und DL-Leucyl-L-tyrosin wurde die kleinste noch nachweisbare Menge bestimmt. Die Dipeptide wurden in Alkohol-Wasser gelöst, sodaß 1 µl der Lösung 0,2 Mikrogramm Substanz enthält und mit einer Dosierspritze steigende Konzentrationen aufgetragen. Mit dem Laufgemisch n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2 wurde chromatographiert und mit Ninhydrin (Sprühreagenz Merck) besprüht. Die Dipeptide waren in einer Konzentration von 0,2 Mikrogramm noch nachzuweisen; das D-Alanyl-L-leucin allerdings nur bis 0,4 Mikrogramm.

g) Bestimmung der geringsten Nachweisbarkeit zweier Diastereomere nebeneinander:

Wegen seiner guten Löslichkeit eignet sich hierzu DL-Alanyl-L-leucin.

Es wurden 10 mg L-Alanyl-L-leucin in 0,1 ml Wasser (Lösung 1) und 10 mg DL-Alanyl-L-leucin in 10 ml Wasser (Lösung 2) gelöst. Von (1) wurden jeweils 10 µl = 1000 Mikrogramm, von (2) steigende Konzentrationen von 0,5 bis 10 µl aufgetragen. Dabei zeigte sich, daß 0,5 Mikrogramm D-Alanyl-L-leucin neben

1000 Mikrogramm L-Alanyl-L-leucin noch nachgewiesen werden können (vgl. Abb.3).

2. Kolorimetrie:

Der Gehalt an Dipeptid wurde kolorimetrisch[x] mit Ninhydrin bestimmt.

Herstellung des Ninhydrinreagenzes[58]:
0,04 g $SnCl_2 . 2\ H_2O$ wurden in 25 ml Zitratpuffer p_H 5 (1,0504 g Zitronensäure.H_2O + 10 ml n-NaOH ad 25 ml Wasser) gelöst. Diese Lösung wurde zu einer Lösung von 1 g Ninhydrin in 25 ml Methylglykol gegeben.
Von diesem Reagenz wurde 1 ml zu 1 ml der zu untersuchenden Dipeptidlösung gegeben, die sich in einem Reagenzglas befindet, das bei 10 ml eine Eichmarke besitzt. Die Reagenzgläser wurden in ein siedendes Wasserbad gestellt, nach 15 Min. herausgenommen, abgekühlt und bis zur Eichmarke mit einer Mischung aus gleichen Teilen Wasser und 96 proz. Äthanol aufgefüllt. Bei 570 mμ wurde die Extinktion bestimmt und zwar immer gegen eine entsprechende Vergleichslösung.

3. Säulenchromatographie:

Auf der Säule wurde versucht, unter gleichen Bedingungen wie bei der Dünnschichtchromatographie eine Trennung in die Diastereomeren zu erzielen.
Die Säule wurde mit Kieselgel gefüllt und das Dipeptid in wenig Elutionsmittel gelöst auf die Säule gegeben. Das Lösungsmittel befindet sich in einem Vorratsgefäß, das über einen Heber und einen Tropftrichter mit der Säule verbunden ist. Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf einen Tropfen in 5 Sek. eingestellt und Fraktionen zu 10 ml abgenommen.
Der Verlauf der Säulenchromatographie wurde durch Kolori-

---

x) Die kolorimetrischen Werte wurden auf einem Zeiss Spektralphotometer PMQ II bestimmt.

metrieren der einzelnen Fraktionen verfolgt; die Trennung in die Diastereomeren läßt sich durch Dünnschichtchromatographie zeigen.

a) DL-Leucyl-L-leucin:

Die verwendete Säule hatte einen Durchmesser von 15 mm und enthielt 50 g Kieselgel (Merck Nr.7729). 60 mg Substanz wurde in wenig n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2 gelöst auf die Säule gegeben und mit demselben Lösungsmittelgemisch eluiert. 17 Fraktionen wurden abgenommen.

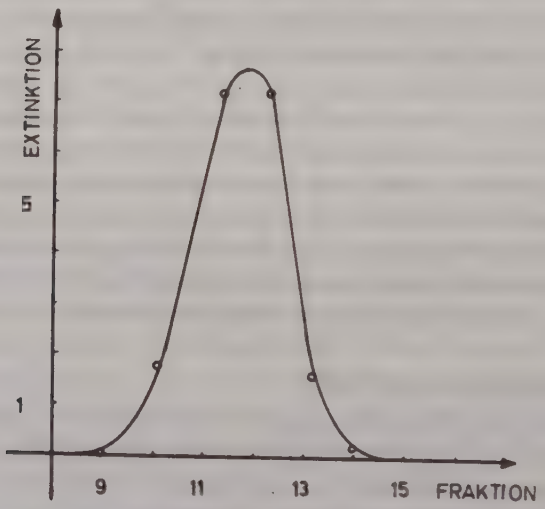

Abbildung 19 Verlauf der Säulenchromatographie von DL-Leucyl-L-leucin.

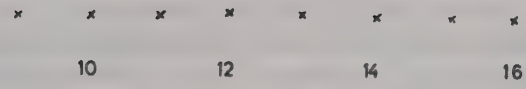

Abbildung 20 Dünnschichtchromatographie der 9. bis 16. Fraktion der Säulenchromatographie von DL-Leucyl-L-leucin.
Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

Bei der Dünnschichtchromatographie der einzelnen Fraktionen der Säulenchromatographie sieht man in der 11. Fraktion reines L-Leucyl-L-leucin, in der 12. und 13. ein Gemisch und die 14. Fraktion enthält reines D-Leucyl-L-leucin.

b) DL-Alanyl-L-leucin:

Die Säule war 17 cm lang, hatte einen Durchmesser von 2 cm und war mit Kieselgel für die Chromato-

graphie unter 0,08 mm (Merck) gefüllt. 54 mg Substanz wurde in wenig n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:2 gelöst auf die Säule gegeben und mit demselben Lösungsmittelsystem eluiert. 16 Fraktionen zu 10 ml wurden abgenommen.
Man sieht bei der Dünnschichtchromatographie der einzelnen Fraktionen in 5 bis 10 L-Alanyl-L-leucin, in der 11. und 12. Fraktion ein Gemisch und in der 12. bis 15. D-Alanyl-L-leucin (vgl. Abb.5).
Kolorimetrie der einzelnen Fraktionen:

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,10	10	0,28
2	0,058	11	0,82
3	0,174	12	2,43
4	0,204	13	2,6
5	0,61	14	2,65
6	2,60	15	2,53
7	2,45	16	2,5
8	1,57		
9	0,83		

Die Kurve (vgl. Abb.4) zeigt bei Fraktion 6,5 und 12,5 zwei Maxima.

4. Craigverteilung:

Als Lösungsmittelsysteme wurden verwendet:

n-Butanol (1)/0,5 proz.Lösung von getrocknetem Natriumsulfat (1)

n-Butanol (1), Amylalkohol (0,025)/Wasser (1)

n-Butanol (1), Amylalkohol (0,025)/0,5 proz.Lösung von getrocknetem Natriumsulfat (1)

n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1)

Petroläther 50-70° (8), Essigester (2)/Methanol (6), Wasser (4).

Die beiden Phasen des Lösungsmittelsystems wurden gegeneinander gesättigt und dann der Verteilungskoeffi-

zient bestimmt. Dieser ist definiert als das Verhältnis der Konzentrationen einer Substanz in der leichten und in der schweren Phase, wenn sich das System im Gleichgewicht befindet.

10 ml leichte und 10 ml schwere Phase wurden in ein Scheideröhrchen gefüllt, 2-5 mg Dipeptid zugegeben und durch Umschütteln das Verteilungsgleichgewicht eingestellt. Um Temperaturänderungen, die den Verteilungskoeffizient beeinflußen, zu vermeiden, wurde das Scheideröhrchen beim Umschütteln nur am Hahn und Stopfen angefaßt. Die Konzentration in den Phasen wurde kolorimetrisch bestimmt: 1 ml der Lösung wurde mit 1 ml Ninhydrinreagenz[58)] versetzt und wie S.53 beschrieben kolorimetriert.
Bei der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten des Dipeptids mit Schutzgruppen wurde zu den Phasen im Scheideröhrchen etwa 30 mg Substanz gegeben und nach dem Einstellen des Verteilungsgleichgewichtes die leichte und die schwere Phase je in ein tariertes Becherglas abgelassen, das Lösungsmittel abgedampft und die Konzentration durch Auswiegen des Rückstandes bestimmt. Die Verteilungen wurden in einer Handapparatur nach Hecker[73)] durchgeführt. In jedes Element wurde 10 ml schwere Phase, in das Element 0 die zu verteilende Substanz und 10 ml leichte Phase gegeben. Die Apparatur wurde 50 mal hin und her geschüttelt, die leichte Phase in das nächste Element transportiert, in das erste wieder 10 ml leichte Phase gegeben und der Vorgang so oft wiederholt, bis sich in jedem Element leichte Phase befand. In Element 2 und 3 wurde vor Beginn der Verteilung 10 ml leichte bzw. 10 ml schwere Phase gegeben; diese läuft dann vorneweg und benetzt die Überlaufgefäße. Auf diese Weise wurde ein allmähliches Abnehmen des Volumens der Phasen eingeschränkt.

---

73) E.HECKER, Chemie-Ing.-Techn. 25, 505 (1953).

Der Verlauf der Verteilung wurde bestimmt, indem der Gehalt jedes Elementes kolorimetrisch bestimmt wurde.

Auswertung der Verteilung:

Ist das Maximum einer Verteilungskurve bekannt, so läßt sich ihr Verlauf nach folgender Gleichung berechnen:

$$T_{n,r} = \frac{n!}{r!\,(n-r)!} \cdot \frac{G^r}{(1+G)^n}$$

$$= \frac{n!}{(1+G)^n} \cdot \frac{G^r}{r!\,(n-r)!}$$

$$= \frac{n!}{(1+G)^n} + r.\log G - \log r! - \log (n-r)!$$

Dabei bedeutet T die relative Substanzmenge eines Elementes, n die Anzahl der insgesamt ausgeführten Verteilungsschritte, r die Fraktionsnummer und G die Verteilungszahl. Die Werte für n! und r! können einer Tabelle entnommen werden[74].

Der Verteilungskoeffizient läßt sich aus der Verteilungskurve auf zwei Arten berechnen:

1. Aus der Lage des Maximums nach der Gleichung

$$K = \frac{r_{max.} + 0{,}5}{(n-r_{max.}) + 0{,}5}$$

wobei $r_{max.}$ die Nummer derjenigen Fraktion ist, auf die das Maximum fällt und n die Anzahl der insgesamt ausgeführten Verteilungsschritte bedeutet. $r_{max.}$ muß nicht immer ganzzahlig sein.

2. Der Verteilungskoeffizient läßt sich auch aus dem Gehalt zweier benachbarter Elemente nach folgender

---

74) E.HECKER, "Verteilungsverfahren im Laboratorium" (1955) Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr.

Gleichung berechnen:

$$G = \frac{y_{n,r}}{y_{n,r-1}} \cdot \frac{r}{n + 1 - r}$$

Dabei bedeuten $y_{n,r}$ und $y_{n,r-1}$ den Gehalt der Fraktionen, r die Fraktionssummer und n die Zahl der insgesamt ausgeführten Verteilungsschritte.

Vom Verteilungskoeffizienten leitet sich der Trennfaktor ß ab. Er ist definiert als das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten zweier Substanzen A und B:

$$ß = \frac{K_A}{K_B}$$

ß ist ein Maß für die Trennmöglichkeit zweier Substanzen und hängt wie der Verteilungskoeffizient von der Zusammensetzung des Lösungsmittelsystems ab.

Craigverteilung von Dipeptiden:

a) Verteilung von L-Leucyl-L-leucin und D-Leucyl-L-leucin, die durch Umkristallisation gewonnen wurden. Phasen: n-Butanol (1)/0,5 proz. Lösung von getrocknetem Natriumsulfat (1). Der Natriumsulfatzusatz erfolgte, um die Emulsionsbildung zu verringern. Verteilung über 20 Stufen.

Die experimentell gefundene Verteilungskurve von L-Leucyl-L-leucin stimmt mit der berechneten überein, während sie sich beim D-Leucyl-L-leucin unterscheiden (vgl. Abb.6).

Berechnung der Verteilungskoeffizienten:
L-Leucyl-L-leucin 0,35
D-Leucyl-L-leucin 0,86
Daraus ergibt sich ein ß-Wert von 2,4.

b) Verteilung von L-Leucyl-L-tyrosin und D-Leucyl-L-tyrosin: L-Leucyl-L-tyrosin [75)76)]:

---

75) E.ABDERHALDEN und A.HIRSZOWSKI, Ber.dtsch.chem.Ges. 41, 2840 (1908).

76) E.WÜNSCH, G.FRIES und A.ZWICK, Chem.Ber. 91, 542 (1958).

Drehung: $[\alpha]_D^{20^\circ} = + 10,4^\circ$ (2% in Wasser).

Schmelzpunkt: 269°.

D-Leucyl-L-tyrosin:

Drehung: $[\alpha]_D^{20^\circ} = - 16,3^\circ$ (2% in Wasser).

Schmelzpunkt: 251°.

Phasen: n-Butanol (1), Amylalkohol (0,025)/0,5 proz. Lösung von geglühtem Natriumsulfat (1).
Verteilung über 20 Stufen.

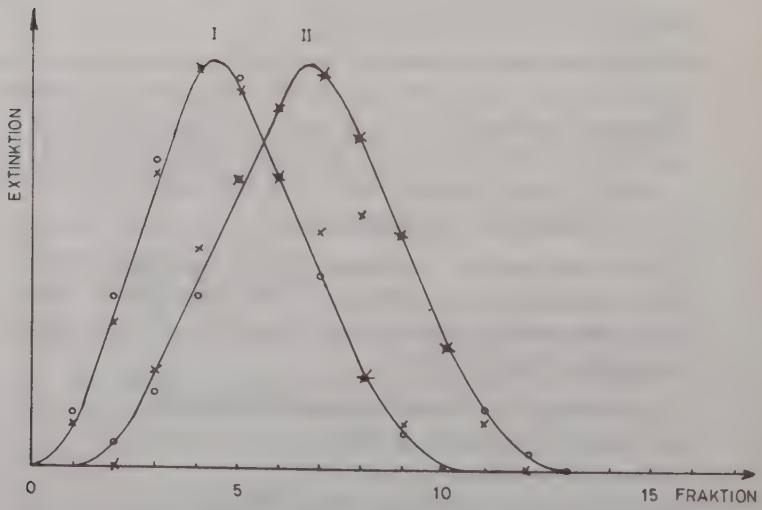

Abbildung 21 Verteilung von D- und L-Leucyl-L-tyrosin. I ist die Verteilungskurve von L-Leucyl-L-tyrosin, II die Verteilungskurve von D-Leucyl-L-tyrosin. x gefundene, o berechnete Werte.

Berechnung der Verteilungskoeffizienten:

L-Leucyl-L-tyrosin 0,3
D-Leucyl-L-tyrosin 0,5.

Daraus ergibt sich ein ß-Wert von 1,7.

c) DL-Leucyl-L-phenylalanin:

Phasen: n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1)
Verteilung über 20 Stufen.

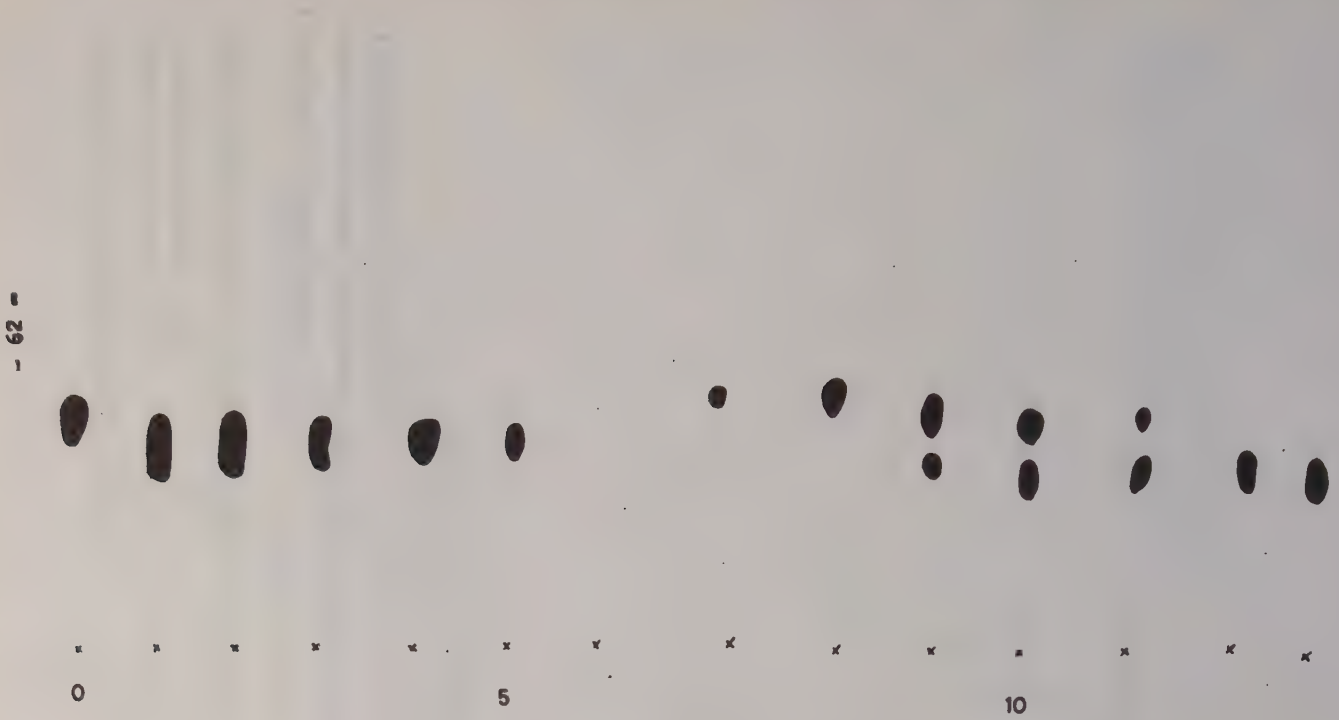

Abbildung 22 Dünnschichtchromatographie der Verteilung von DL-Leucyl-L-phenylalanin über 20 Stufen. Phasen: n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1). Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

Durch Dünnschichtchromatographie der einzelnen Fraktionen mit dem Laufgemisch n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:2 auf einer Kieselgelplatte (Abb.22) kann man sehen, daß die Flecke in Fraktion 0 bis 5 mit freier Aminosäure identisch sind, in Fraktion 9 bis 15 aber eine Trennung in die Diastereomeren eingetreten ist.

Berechnung des Verteilungskoeffizienten:

1. Aus der Kurve Abb.7 ergibt sich ein Maximum bei 11,3. Daraus läßt sich der Verteilungskoeffizient mit 1,3 errechnen.
2. Bei der Berechnung des Verteilungskoeffizienten aus dem Gehalt zweier benachbarter Fraktionen erhält man für die 9. und 10. Fraktion 1,5, für die 13., 14. und 15. Fraktion 1,03. Dieser Unterschied, der einen ß-Wert von 1,45 bedeutet, zeigt ebenfalls, daß eine Trennung des DL-Leucyl-L-phenylalanins in seine Diastereomeren durch die Verteilung eingetreten ist.

d) DL-Phenylalanyl-L-leucin:

Phasen: n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1)
Verteilung über 24 Stufen.

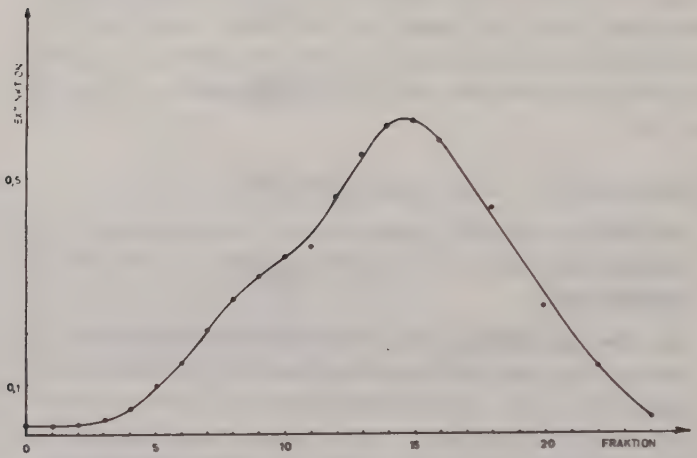

Abbildung 23 Verteilungskurve von DL-Phenylalanyl-L-leucin. Verteilung über 24 Stufen mit den Phasen n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1).

Aus dieser Verteilungskurve läßt sich für die eine Substanz ein ungefährer Verteilungskoeffizient von 1,7, für die andere einer von 0,85 errechnen. Dies entspricht einem ß-Wert von 2.

Um die Trennung des DL-Phenylalanyl-L-leucins in seine Diastereomeren bei der Verteilung zeigen zu können, wurde der Inhalt jedes Elementes dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Laufgemisch wurde n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:2 verwendet.

Das 11. bis 14. Element enthält reines L-Phenylalanyl-L-leucin, das 15. und 16. ein Gemisch und das 17. bis 19. reines D-Phenylalanyl-L-leucin.

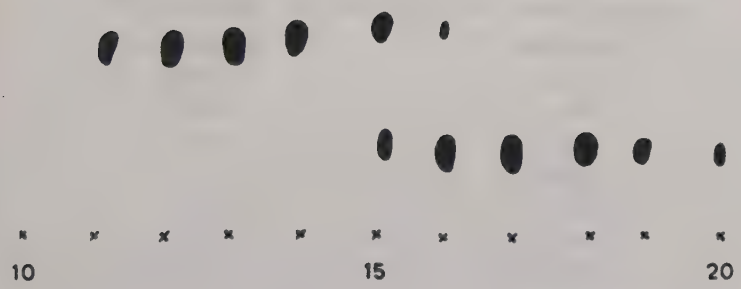

Abbildung 24 Dünnschichtchromatographie der Verteilung von DL-Phenylalanyl-L-leucin. Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

e) DL-Alanyl-L-leucin:

Dieses Dipeptid besitzt eine sehr gute Wasserlöslichkeit, so daß nach einem geeigneten Lösungsmittelsystem für die Verteilung gesucht werden muß:

1.Verteilung
Leichte Phase: n-Butanol (1)
Schwere Phase: 0,5 proz. Lösung von geglühtem Natriumsulfat (1).

Fraktion	Extinktion
0	2,52
1	2,62
2	1,43
3	0,314
4	0,042
.	.
20	0

2.Verteilung:
Leichte Phase: Essigester, Isopropanol 25:25
Schwere Phase: Magnesiumsulfat, Wasser 20:20

Fraktion	Extinktion
0	1,38
1	0,23
2	0,01
3	0
.	.
20	0

3.Verteilung:
Leichte Phase: n-Butanol 1
Schwere Phase: Magnesiumsulfat, Wasser 0,5:1

Fraktion	Extinktion
0	1,42
1	0,11
2	0,04
3	0
.	.
20	0

4.Verteilung:
Leichte Phase: Isopropanol 0,6
Schwere Phase: Magnesiumsulfat, Wasser 0,5:1

Fraktion	Extinktion
0	0,139
1	0,378
2	0,134
3	0
.	.
20	0

5.Verteilung:
Leichte Phase: n-Butanol (1)
Schwere Phase: n-Natriumphosphatlösung (1)

Fraktion	Extinktion
0	12,0
1	7,0
2	2,18
3	1,13
4	0,464
5	0,133
6	0,077
8	0,037
10	0
.	.
20	0

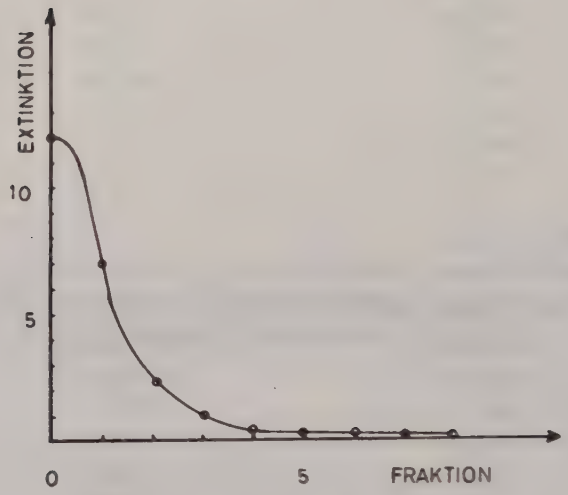

Abbildung 25 Verteilungskurve von DL-Alanyl-L-leucin. Verteilung über 20 Stufen mit den Phasen n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1).

Man sieht also, daß das Dipeptid durch seine gute Wasserlöslichkeit in allen Systemen einen sehr niedrigen Verteilungskoeffizient besitzt. Um feststellen zu können, ob trotzdem eine Trennung eingetreten ist, wird von der letzten Verteilung ein Dünnschichtchromatogramm hergestellt. Als Laufgemisch wurde n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:2 verwendet. Dabei zeigte sich, daß Fraktion 0 und 1 L-Alanyl-L-leucin neben D-Alanyl-L-leucin, Fraktion 2 überwiegend D-Alanyl-L-leucin und Fraktion 3, 4, 5 nur D-Alanyl-L-leucin enthalten.

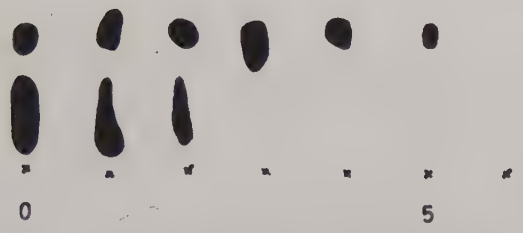

Abbildung 26 Dünnschichtchromatogramm der Verteilung von DL-Alanyl-L-leucin über 20 Stufen. Laufgemisch: n-Butanol, Eisessig, Wasser 8:2:2.

Es wurden nun in einer zwanzigstufigen Apparatur 149 Verteilungsschritte ausgeführt.
Die Verteilungskurve in Abb.27 zeigt in der 3.Fraktion ein deutliches Maximum (D-Alanyl-L-leucin). Das zweite Maximum ist nicht ausgeprägt, da sich L-Alanyl-L-leucin wesentlich schlechter mit Ninhydrin anfärbt und außerdem die Konzentration in diesen Elementen kleiner ist.

Fraktion 0 bis 19 wurde dünnschichtchromatographisch untersucht (vgl. Abb.8). Als Laufgemisch diente n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:2. Man sieht, daß sich in Element 1 bis 6 reines D-Alanyl-L-leucin, in 9 bis 22 reines L-Alanyl-L-leucin und in 7 und 8 ein Gemisch befindet.

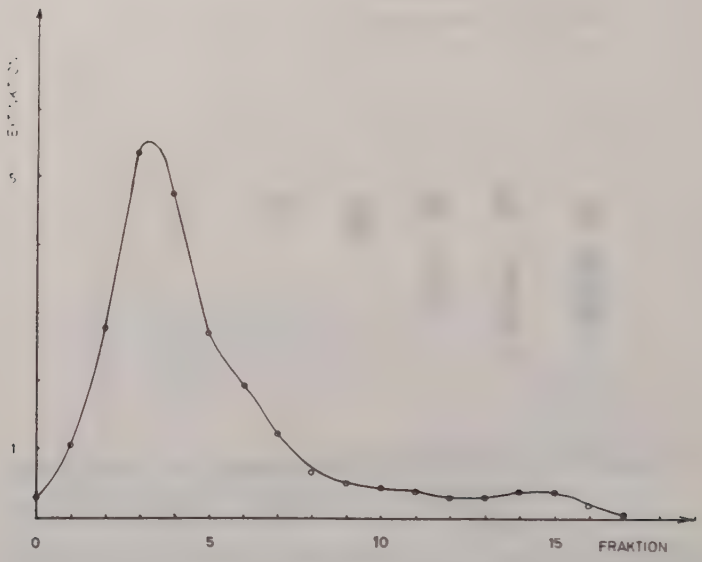

Abbildung 27 Verteilungskurve von DL-Alanyl-L-leucin. 149 Verteilungsschritte in einer zwanzigstufigen Apparatur. Phasen: n-Butanol (1)/ n-Natriumphosphatlösung (1).

f) DL-Alanyl-DL-valin:

Phasen: n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1).
Verteilung über 24 Stufen.

Fraktion	Extinktion
0	2,4
1	2,13
2	0,765
3	0,188
4	0,038
5	0,016
6	0,02
7	0,005
•	•
24	0

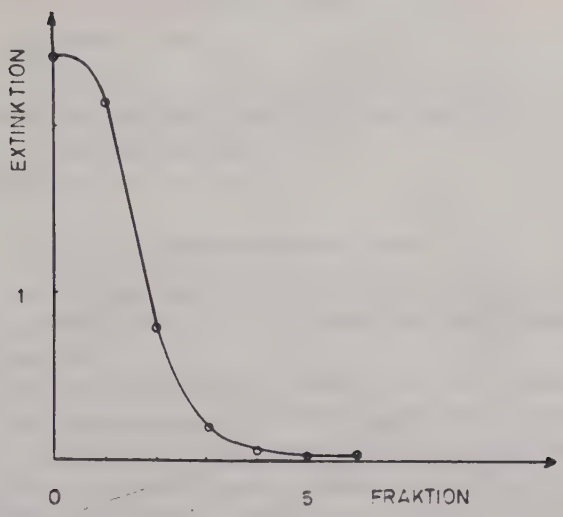

Abbildung 28 Verteilungskurve von DL-Alanyl-DL-valin. Verteilung über 24 Stufen mit den Phasen n-Butanol (1)/n-Natriumphosphatlösung (1).

Um zu sehen, ob eine Trennung in die Diastereomeren durch Verteilung möglich ist, wurden auch hier 149 Verteilungsschritte ausgeführt.

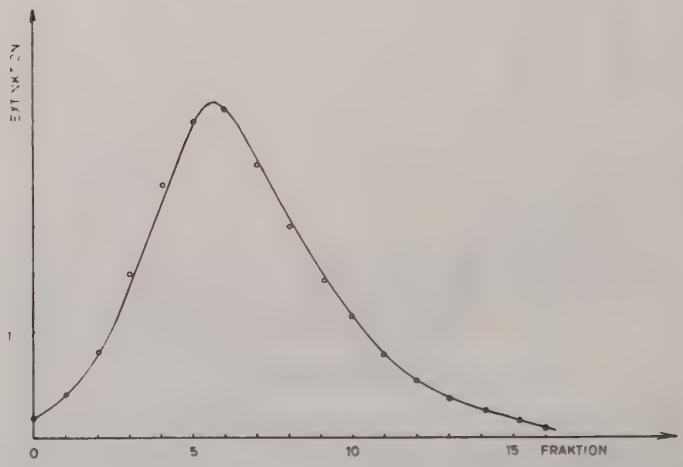

Abbildung 29 Verteilungskurve von DL-Alanyl-DL-valin. 149 Verteilungsschritte in einer zwanzigstufigen Apparatur. Phasen: n-Butanol (1)/ n-Natriumphosphatlösung (1).

Der Verlauf der Kurve deutet darauf hin, daß keine Auftrennung stattgefunden hat, was durch die Dünnschichtchromatographie der einzelnen Elemente (vgl. Abb.9) mit dem Laufgemisch n-Butanol, Wasser, Eisessig 8:2:2 bewiesen werden konnte.

g) Z-L-Leucyl-L-phenylalaninäthylester:
Die quantitativen Bestimmungen wurden hier durch Auswiegen der Substanz nach dem Abdampfen des Lösungsmittels durchgeführt.
Bestimmung des Verteilungskoeffizienten:

Leichte Phase	Schwere Phase	Vert.koeff.
1. Petroläther (50-70°) Essigester 1:1	Wasser, Methanol 1:1	
0,026	0,0034	7,65

2. Petroläther (50-70°) Wasser, Methanol

Essigester	8:2	4:6	
	0,0238	0,0169	1,4

Phasen: Petroläther (50-70°), Essigester 8:2
Wasser, Methanol 4:6.
Verteilung über 20 Stufen.

h) Z-D-Leucyl-L-phenylalaninäthylester:

Die Verteilung wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie beim Z-L-Leucyl-L-phenylalanin-äthylester.
Für beide Diastereomere erhält man die gleiche Kurve. Bei der Berechnung des Verteilungskoeffizienten aus dem Maximum der Kurven erhält man für beide den Wert 1,4. Eine Trennung durch Verteilung ist also nicht möglich.

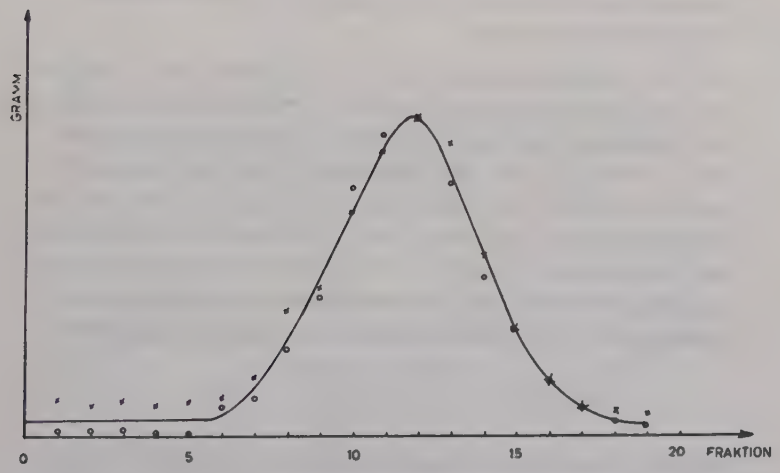

Abbildung 30 Verteilungskurve von Z-L-Leucyl-L-phenyl-alaninäthylester (x) und Z-D-Leucyl-L-phenylalaninäthylester(o). Verteilung über 20 Stufen mit dem System Petroläther (50-70°), Essigester 8:2/Wasser, Methanol 4:6.

III. Präparative Verteilung

Für die präparative Verteilung steht eine Gegenstromapparatur zur Verfügung, die nach dem VAN DIJCK-Prinzip[59)60)] arbeitet.

Die Apparatur besteht aus 4 hintereinandergeschalteten Kolonnen, in denen sich Rühr- und Entmischzonen abwechseln. Die Kolonnen werden mit schwerer Phase gefüllt und leichte Phase aus einem Vorratsgefäß mit Hilfe einer Dosierpumpe am unteren Ende von Kolonne 4 zugeführt. Die leichte Phase mischt sich in der Rührzone intensiv mit der schweren, setzt sich dann in der Entmischzone wieder ab usw. Die Abnahme der leichten Phase erfolgt am oberen Ende von Kolonne 1. Umgekehrt wird die schwere Phase am oberen Ende von Kolonne 1 ebenfalls mit einer Dosierpumpe zugegeben. Sie läuft der leichten Phase entgegen und wird am unteren Ende von Kolonne 1 abgenommen. Der Phasentransport von einer Kolonne zur anderen wird durch Pumpen besorgt.

Für die Substanzzugabe, die in der Mitte der Apparatur erfolgt, wird ein Soxhlet in die Leitung für leichte Phase eingebaut, der die Substanz in einer Extraktionshülse enthält. Dies war notwendig, da sich Dipeptide schlecht lösen. Die Phasengeschwindigkeit wird an den Dosierpumpen für leichte bzw. schwere Phase vor Beginn der Verteilung entsprechend dem Verteilungskoeffizienten eingestellt. Das Geschwindigkeitsverhältnis der Phasen läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$\varphi = \sqrt{\frac{1}{K_A \cdot K_B}}$$

wobei K_A der Verteilungskoeffizient des einen, K_B der des anderen Diastereomeren bedeutet.

1. L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid:

a) Reinigung der Substanz:

Das aus der Synthese erhaltene L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid wurde durch Verteilung über eine Kolonne bei nicht bewegter schwerer Phase gereinigt. Die Zugabe der leichten Phase wird so eingestellt, daß in den ersten beiden Fraktionen Reinsubstanz erhalten wird.

Phasen: Petroläther (50-70°), Essigester 1:1/ Methanol, Wasser 1:1.

Substanzzugabe erfolgte hier auf einmal am unteren Ende der Kolonne; die Fraktionen wurden am oberen Ende abgenommen.

Aufarbeitung: Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 30 bis 40° abdestilliert und der Rückstand gewogen.

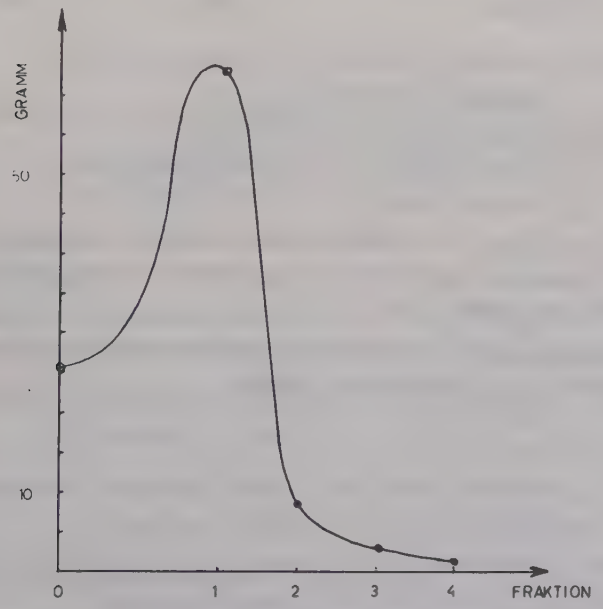

Abbildung 31 Verteilungskurve der Reinigung von L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid. Phasen: Petroläther (50-70°), Essigester 1:1/Methanol, Wasser 1:1.

b) Gegenstromverteilung von L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid:

Bestimmung des Verteilungskoeffizienten:
Dieser wurde durch Auswiegen der Substanz, wie S.57 beschrieben, bestimmt:

Leichte Phase	Schwere Phase	Vert.koeff.
1. Petroläther (50-70°) Essigester 8:2	Methanol, Wasser 8:2	
0,049	0,105	0,47
2. Petroläther (50-70°) Essigester 8:2	Methanol, Wasser 7:3	
0,1034	0,1632	0,64
3. Petroläther (50-70°) Essigester 8:2	Methanol, Wasser 6,5:3,5	
0,096	0,1106	0,87

Phasen: Petroläther (50-70°), Essigester 8:2/ Methanol, Wasser 6,5 : 3,5.

Phasengeschwindigkeit:
Leichte Phase 1,17 Min. für 25 ml
Schwere Phase 1,5 Min. für 25 ml.

Es wurde über 4 Kolonnen verteilt und die Substanz auf einmal in der Mitte der Apparatur in die leichte Phase zugegeben.

Aufarbeitung: Die Fraktionen wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand gewogen.

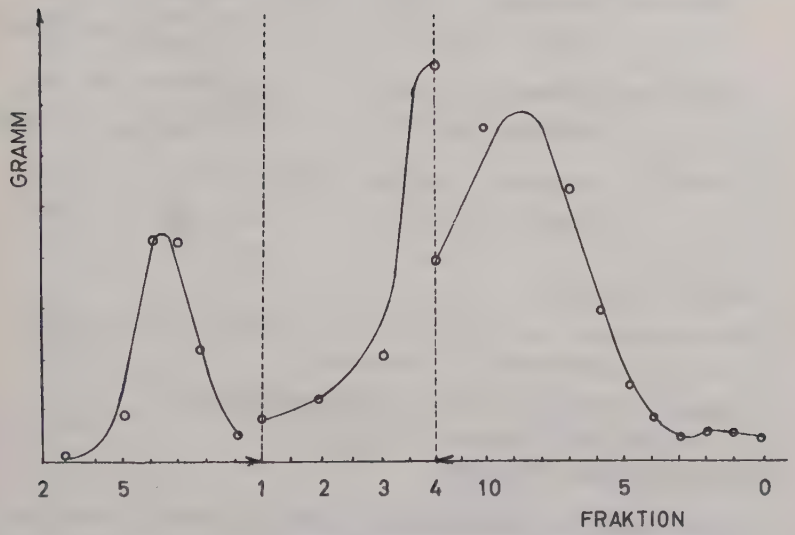

Abbildung 32 Verteilungskurven der Gegenstromverteilung von L-Leucinäthylester-DL-mandelsäureamid. Links die Kurve der schweren, rechts der leichten Phase und in der Mitte die der Kolonne.

Drehungen der einzelnen Fraktionen:

Leichte Phase

6. Fraktion: Einwaage 0,2424 g in 10 ml Methanol, 10 cm Küvette, Hg 436, $\alpha = -1{,}7^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }436} = -70^{\circ}$.

8. Fraktion: Einwaage 0,3861 g in 10 ml Methanol, 10 cm Küvette, Hg 436, $\alpha = -2{,}73^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }436} = -71^{\circ}$.

10. Fraktion: Einwaage 0,2540 g in 10 ml Methanol, 10 cm Küvette, Hg 436, $\alpha = -1{,}82^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }436} = -71{,}7^{\circ}$.

12. Fraktion: Einwaage 0,2075 g in 10 ml Methanol, 10 cm Küvette, Hg 436, $\alpha = -1{,}47^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }436} = -71^{\circ}$.

Schwere Phase:

5. Fraktion: Einwaage 0,1366 g in 10 ml Methanol, 10 cm Küvette, Hg 436, $\alpha = -1{,}05^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{Hg\ 436} = -76{,}6^{\circ}$.

6. Fraktion: Einwaage 0,1492 g in 10 ml Methanol, 10 cm Küvette, Hg 436, $\alpha = -1{,}1^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{Hg\ 436} = -73{,}6^{\circ}$.

8. Fraktion: Einwaage 0,2495 g in 10 ml Methanol, 10 cm Küvette, Hg 436, $\alpha = -1{,}84^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{Hg\ 436} = -74^{\circ}$.

Craigverteilungen:

Die Substanz der schweren und der leichten Phase wurden in der Craigapparatur[73] verteilt.

Phasen: Petroläther (50-70°), Essigester 8:2/ Methanol, Wasser 6,5 : 3,5.
Verteilung über 20 Stufen.

Aufarbeitung: Die leichte Phase jedes Elementes wurde abgedampft und der Rückstand gewogen.
Der Verlauf der Kurve war bei der Substanz aus der leichten und der schweren Phase identisch.

2. DL-Leucyl-L-leucin:

Phasen: n-Butanol (1), Amylalkohol (0,025)/Wasser (1).

Verteilungskoeffizient: Dieser ist aus der Craigverteilung bekannt und beträgt für L-Leucyl-L-leucin 0,35, für D-Leucyl-L-leucin 0,86.

Phasengeschwindigkeit:

Leichte Phase	1,04 Min. für 5 ml
Schwere Phase	1,89 Min. für 5 ml.

Eingesetzte Menge: 9 g DL-Leucyl-L-leucin.

Bei der leichten Phase wurden Fraktionen zu 500 ml, bei der schweren zu 300 ml abgenommen. Der Verlauf der Verteilungskurve wurde in üblicher Weise durch Kolorimetrieren der einzelnen Fraktionen bestimmt (Abb.33).

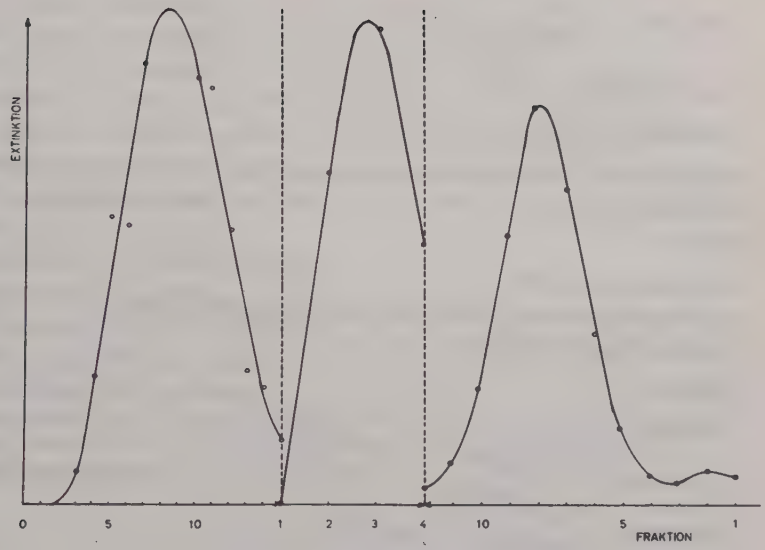

Abbildung 33 Verteilungskurven der Gegenstromverteilung von DL-Leucyl-L-leucin. Links die Kurve der schweren, rechts die der leichten Phase und in der Mitte die der Kolonnen.

Aufarbeiten der leichten Phase:

Die Fraktionen wurden im Vakuum bei 30-40° eingedampft. Von der zurückbleibenden Substanz wurden nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator Äquivalentgewicht, Drehung und Schmelzpunkt bestimmt und ein IR-Spektrum aufgenommen:

Äquivalentgewicht:

Einwaage 0,1165 g, Verbrauch an n/10-KOH 4,17 ml, Äquivalentgewicht 280.

Drehung:

Einwaage 0,1080 g in 10 ml n-HCl, Hg 578, 10 cm Küvette,

$\alpha = -1{,}5^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }578} = -63^{\circ}$, bezogen auf wasserfreie Substanz $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }578} = -71^{\circ}$.

Schmelzpunkt: 273°

Ausbeute an D-Leucyl-L-leucin: 3,5 g.

Aufarbeiten der schweren Phase und des Kolonneninhaltes: Die Lösungsmittel wurden bei 30-50° im Vakuum abdestilliert.

Äquivalentgewicht:
Einwaage 0,0891 g, Verbrauch an n/10-KOH 3,38 ml, Äquivalentgewicht 264.

Drehung:
Einwaage 0,0963 g in 10 ml n-NaOH, Hg 578, 10 cm Küvette,

$\alpha = -0{,}13^{\circ}$, $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }578} = -13{,}7^{\circ}$, bezogen auf wasserfreie Substanz $[\alpha]^{20^{\circ}}_{\text{Hg }578} = -14{,}7^{\circ}$.

Schmelzpunkt 262°.

Ausbeute an L-Leucyl-L-leucin: 4,4 g.

Craigverteilung von Substanz aus der schweren und der leichten Phase:
Als Phasen wurden entsprechend n-Butanol (1), Amylalkohol (0,025)/Wasser (1) verwendet, über 20 Stufen verteilt und der Gehalt in den Elementen kolorimetrisch bestimmt.
Die beiden experimentell gefundenen Verteilungskurven (vgl. Abb.10) stimmen mit den berechneten überein.

IV. Deutung der IR-Spektren von Dipeptiden

Von folgenden Dipeptiden lagen IR-Spektren vor:

L-Leucyl-L-leucin
D-Leucyl-L-leucin
L-Leucyl-L-tyrosin
D-Leucyl-L-tyrosin
L-Leucyl-L-phenylalanin
DL-Leucyl-L-phenylalanin
L-Alanyl-L-leucin
DL-Alanyl-L-leucin
DL-Alanyl-DL-alanin
DL-Alanyl-DL-phenylalanin
DL-Alanyl-DL-serin
DL-Alanyl-DL-norleucin
DL-Alanyl-DL-asparagin
DL-Alanyl-DL-methionin

Als Beispiel soll L-Leucyl-L-tyrosin und D-Leucyl-L-tyrosin dienen:

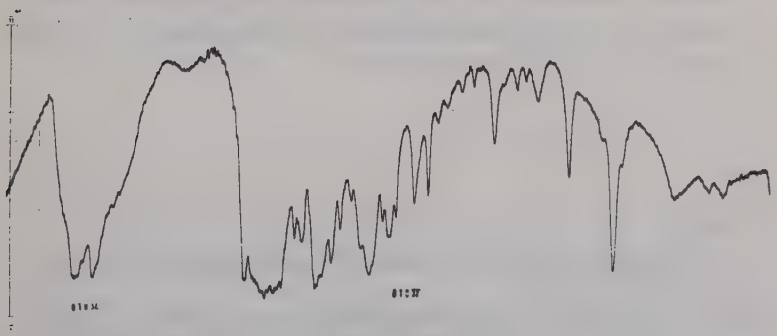

Abbildung 34 IR-Spektrum von L-Leucyl-L-tyrosin.

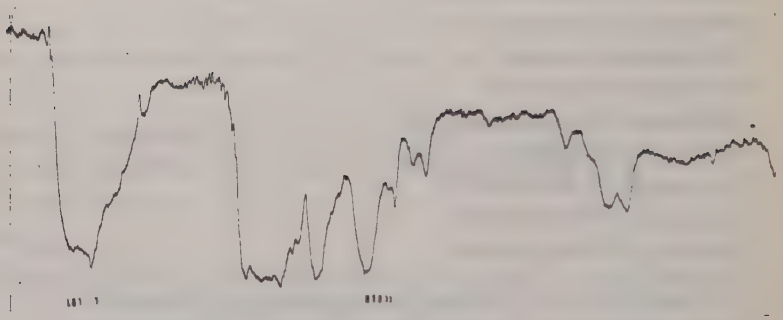

Abbildung 35 IR-Spektrum von D-Leucyl-L-tyrosin

Es wird versucht, die oft schlecht ausgebildeten Banden in den sehr komplexen Spektren in Anlehnung an die Literatur[77)78)79)80)] zuzuordnen:

---

77) E.R.BLOUT und S.G.LINSLEY, J.Amer.chem.Soc. 74, 1946 (1952).

78) L.J.BELLAMY, "Ultrarotspektrum und chemische Konstitution", deutsche Übersetzung von Dr.W.BRÜGEL, Verlag D.Steinkopff, Darmstadt (1955).

79) E.ELLENBOGEN, J.Amer.chem.Soc. 78, 363 (1956).

80) H.ZAHN und N.H. LA FRANCE, Liebigs Ann.Chem. 630, 37 (1960).

Zuordnung	Wellenzahlen in cm^{-1}
N-H Valenz	3070 - 3450
C-H-Valenz	2940 - 2995
C=O Valenz	1670 - 1685
COO^- Vibration	1400
C-H Deformation	1305 - 1470
N-H Deformation	1205 - 1295
CH_2-Gerüstschwingungen	1120 - 1190
C-N-C Valenz	1000 - 1100
C-H, N-H rocking	910 - 980
C-H, N-H rocking und Benzol-wagging	700 - 870

Die IR-Spektren von Dipeptiden und ihrer Diastereomerer unterscheiden sich nur geringfügig, und es ist bei diesen großen Molekülen eine charakteristische Zuordnung kaum möglich.

Lebenslauf

Am 15. Dezember 1938 wurde ich, Helmut Karl Pfrommer, als Sohn des Ingenieurs Gustav Pfrommer und seiner Ehefrau Martha, geb. Bubeck, in Stuttgart geboren.

Von 1944 bis 1948 besuchte ich die Grundschule und anschließend das Wirtemberg-Gymnasium in Stuttgart-Untertürkheim, wo ich im März 1957 die Reifeprüfung ablegte. Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Apotheke Obertürkheim bei Herrn Apotheker Haas bestand ich die Pharmazeutische Vorprüfung im März 1959 vor dem Prüfungsausschuß in Stuttgart. Im Sommersemester 1959 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Pharmazie, das ich mit der Pharmazeutischen Prüfung im April 1962 vor dem Prüfungsausschuß in Tübingen abschloß. Im Sommersemester 1962 begann ich am Pharmazeutisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr. Dr.h.c. Walter Hückel und Herrn Dr.Feltkamp mit der Ausführung der vorliegenden Arbeit. Als Kandidat der Pharmazie arbeitete ich vertretungsweise in der Herdweg-Apotheke Stuttgart bei Herrn Dr.Frank und erhielt am 25.April 1963 die Bestallung als Apotheker. Seit dem Sommersemester 1962 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft und seit dem Wintersemester 1963/64 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Pharmazeutisch-chemischen Institut der Universität Tübingen tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Walter Hückel waren die Herren Professoren und Dozenten C.H.Brieskorn, W.Cyran, E.Graf, K.Hummel, H.Kaiser (Pharmazie), M.Hanack, E.Müller, W.Rüdorff (Chemie), E.Bünning, A.Grahle, K.Mägdefrau, H.Metzner, W.Zimmermann (Botanik), H.Kurtz, F.Lembeck, P.Pulewka (Pharmakologie), G.Weitzel (physiologische Chemie), F.P.Möhres (Zoologie und Zoophysiologie), K.Mörike (Anatomie), H.Krüger (Physik).

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen